

การเตรียมตัวอย่างและการเปรียบเทียบผลทดสอบ ระหว่างห้องปฏิบัติการ



Proficiency Testing Services Division
National Food Institute
Ministry of Industry, Thailand

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

(Interlaboratory Comparison, ILC)

การประเมินความสามารถและการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสองห้องปฏิบัติการหรือมากกว่า ในการวัดตัวอย่างเดียวกัน ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดไว้แล้ว

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT)

การพิจารณาความสามารถของห้องปฏิบัติการในการทดสอบ โดยการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ และการทดสอบความชำนาญ

มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ เพื่อติดตามความต่อเนื่อง
ของความสามารถของห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อระบุปัญหาภายในห้องปฏิบัติการอันจะนำไปสู่การปรับปรุงแก้ไข
3. เพื่อให้เกิดการเปรียบเทียบกันได้ของวิธีการทดสอบหรือการวัด
4. เพื่อเพิ่มความมั่นใจให้กับลูกค้าของห้องปฏิบัติการ
5. เพื่อระบุความแตกต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ
6. เพื่อศึกษาห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการวัดเปรียบเทียบโดยพิจารณาจากผลที่ได้
7. เพื่อยืนยันผลการประเมินค่าความไม่แน่นอน

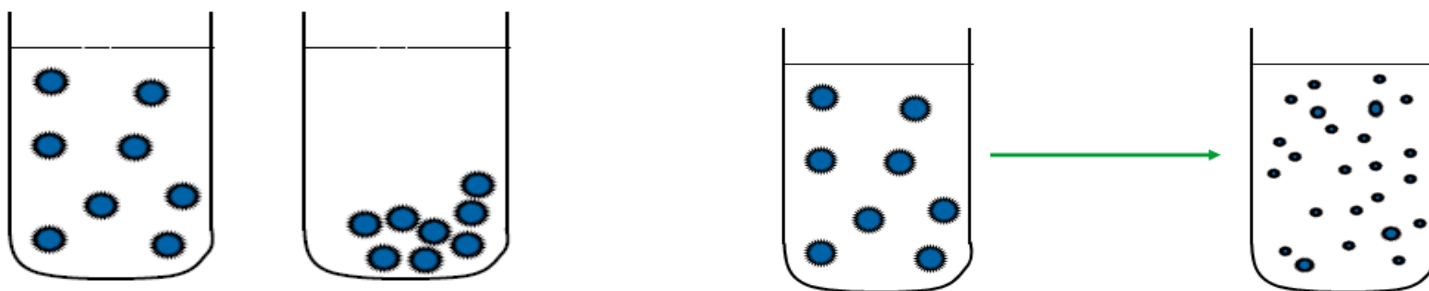
N 07 15 003 นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ, การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ และการประเมินความสามารถการทดสอบ

1. กรณีมีแหล่งเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ ต้องเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ
2. กรณีไม่มีแหล่งเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ ให้เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ 2 แห่งหรือ มากกว่า โดยห้องปฏิบัติการต้องจัดทำเอกสารขั้นตอนการปฏิบัติเรื่อง การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องมีรายละเอียดการเตรียมตัวอย่าง การกำหนดค่าสารที่ทดสอบในตัวอย่าง สถิติที่ใช้ประเมิน และเกณฑ์การเลือกห้องปฏิบัติการที่จะเปรียบเทียบผลทดสอบ (โดยห้องปฏิบัติการที่จะเปรียบเทียบกับผลด้วยต้องได้รับการรับรองความสามารถ ISO/IEC 17025:2005)

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ

- ❖ หากเป็นไปได้ ให้ใช้ matrix ที่เหมือนกับตัวอย่างที่ทดสอบเป็นประจำ
- ❖ ต้องมั่นใจว่าวัสดุอ้างอิงนั้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาที่ทำการทดสอบ



ชนิดตัวอย่าง

ตัวอย่างทดสอบทางเคมี

- **Matrix**
- **Spiked matrix**

ตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา

- **Lyophilized cultures**
- **Matrix (Natural contamination)**
- **Matrix (Artificial contamination)**

Choose parameter and matrix

E.g.

The test materials for FEPAS® distribution 149 were dispatched in February 2010. Test materials for ten proficiency tests were available in this distribution: enumeration of lactic acid bacteria (10 g equivalent, beef) M0126, enumeration of Enterobacteriaceae (10 g, milk powder) M0331, enumeration of coagulase positive staphylococci (10 g equivalent, beef) M0854, aerobic plate count (10 g, milk powder) M0964, detection of *Listeria monocytogenes* (25g equivalent, chicken) M0257, detection of *Listeria monocytogenes* (25g, milk powder) M0258, detection of *Campylobacter* spp. (25g equivalent, chicken) M0438, detection of *Salmonella* spp. (25g equivalent, parsley) M0789, detection of *Escherichia coli* O157 (25g, dried milk) M1042r and detection of *Escherichia coli* O157 (25g equivalent beef) M1043.

Preparation

The test material prepared by a laboratory contracted to do by FAPAS

Commercially available cartons of grapefruit juice were shaken well before being emptied into a large vessel and mixed (for 120 minutes) using a circulation pump. The juice was transferred into glass bottles and capped with a crown seal, the circulation process continued during the filling process to prevent separation. The bottles and contents were retort pasteurized at 90°C in static raining water mode. They were stored at +4°C prior to dispatch

การเตรียมตัวอย่างทางเคมี

Blender&Mixer



การเตรียมตัวอย่างทางเคมี

ลักษณะตัวอย่าง: Liquid หรือ Paste



วิธีการเตรียมตัวอย่าง

- ปั่น ลับผสม หรือผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
- บางรายการทดสอบต้องมีการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์
- บรรจุใส่ภาชนะที่เหมาะสม อาจฆ่าเชื้อด้วยความร้อน
- ตัวอย่างหลังจากเตรียมเสร็จ เก็บในตู้เย็น ตู้แช่แข็ง หรือเก็บอุณหภูมิห้อง

Sample Preparation

Canned food

8 kg canned food (for 45 bottles)



blend and mix well



fill in bottle glass (150 g/bottle)



autoclave at 121°C, 15 min



label and keep at room temperature



Sample Preparation

Oxolinic acid in Shrimp



5 kg shrimp (for 45 packages)



remove shrimp shells and head



Wash and blend



**add a spiking solution of
Oxolinic acid to the sample**



mix 1 hour



pack in plastic bags and seal (30g/pack)
pack the samples in aluminum foil bags and seal
label and keep in freezer at -20°C



การเตรียมตัวอย่างทางเคมี

ลักษณะตัวอย่าง: Powder

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

- **Dry matrix or freeze dried matrix: blend, sieve and mix**
- บรรจุใส่ภาชนะบรรจุที่เหมาะสม อาจจะบรรจุสุญญากาศ
- ตัวอย่างหลังจากเตรียมเสร็จ เก็บอุณหภูมิห้อง



PT Sample Preparation

Moisture in feed



3 kg feed (for 45 samples)

blend



sieve (sieve size 1.4 mm)



mix well



vacuum pack (20 g/pack) in plastic bag



pack the samples in aluminum foil bags



label and keep at room temp



การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

ISO/TS22117: 2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง

1. ระดับการปนเปื้อนของเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism)

- ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อวิธีการทดสอบนั้นๆ
- ระดับการปนเปื้อนต้องอยู่ในระดับเดียวกับที่พบในตัวอย่างที่ทดสอบเป็นประจำ และหากเป็นการทดสอบเชิงปริมาณ (Enumeration) บางครั้งเพื่อต้องการทดสอบความสามารถของผู้เข้าร่วมมากยิ่งขึ้น ระดับการปนเปื้อนต้องอยู่ระดับ LOQ ของวิธีการทดสอบ
- ระดับการปนเปื้อนต้องไม่ต่ำจนเกินไปต้องคำนึงถึงการทำการเจือจาง และจำนวนโคโลนีบน plate เช่น ไม่ต่ำกว่า 10 โคโลนี

E.g. Result of homogeneity check for *Clostridium perfringens*

Sample	Rep 1 (cfu/g)	Rep 2 (cfu/g)
1	1,200	950
2	1,200	1,100
3	1,200	1,600
4	1,500	550
5	1,600	1,300
6	1,800	1,200
7	1,800	1,400
8	2,000	1,400
9	650	1,000
10	2,200	1,900

ANOVA

<i>F</i>	<i>F crit</i>
1.896	3.020

Although the sample batch A is homogeneous but it is not suitable to provide to participants because it is low count of colony. Due to the method for *C. perfringens* enumeration (FDA-BAM online): select TSC agar plate that contain 20-200 typical colonies for colony counting.

การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

ISO/TS22117: 2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

1 ระดับการปนเปื้อนของเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) (ต่อ)

- ถ้าเชื้อเป้าหมายเป็นเชื้อก่อโรค ระดับปนเปื้อนต้องอยู่ในระดับเดียวกันกับระดับที่ก่อให้เกิดอันตรายกับคน
- หากเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ (Detection method) ระดับการปนเปื้อนต้องอยู่ในระดับต่ำ เพื่อเป็นการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ และตรวจสอบ LOD ของแต่ละห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม

การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

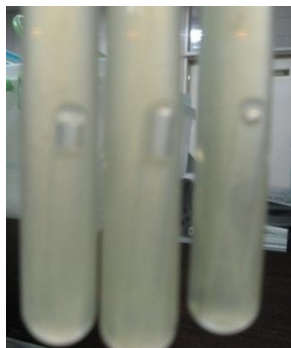
2. แหล่ง คุณลักษณะของเชื้อ และการสอบกลับได้ของเชื้อเป้าหมาย

- ก่อนทำการเตรียมตัวอย่างต้องทดสอบคุณลักษณะของเชื้อ ว่าสามารถใช้ทดสอบได้กับวิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน

เช่น การทดสอบ *E. coli* (MPN/g)

Ref method: FDA-BAM online: 2002 Ch 4

ISO4831:2006, APHA: 2003, etc.



EC broth, 45.5°C

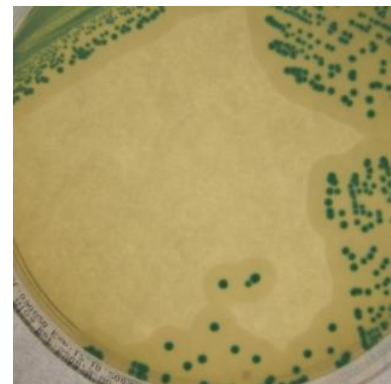
การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

2. แหล่ง คุณลักษณะของเชื้อ และการสอบกลับได้ของเชื้อเป้าหมาย

- ทั้ง typical และ atypical strains ควรเติมในตัวอย่างเพื่อเป็นการทดสอบความสามารถห้องปฏิบัติการ

เช่น การทดสอบเชื้อ *L. monocytogenes* ควรเติม atypical strains
L. innocua หรือ *L. ivanovii* หรือ other *Listeria* species



L. monocytogenes

การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

2. แหล่ง คุณลักษณะของเชื้อ และการสอบกลับได้ของเชื้อเป้าหมาย

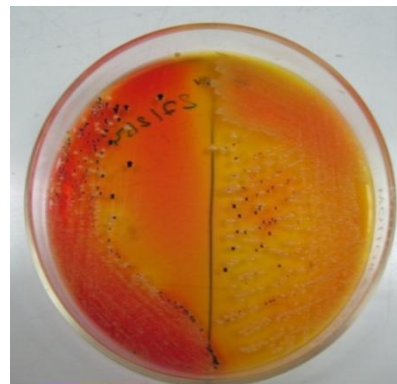
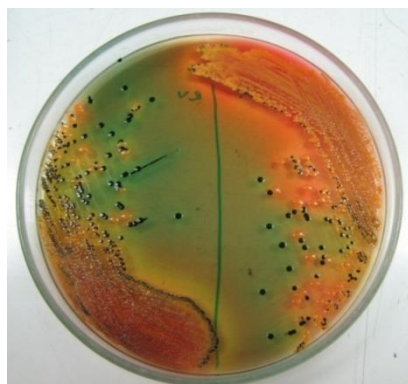
- เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงควรได้จาก International หรือ National culture collection
- หากใช้เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง ก่อนใช้ต้องศึกษาคุณลักษณะของเชื้อโดยใช้ International Standard reference method เพื่อให้มั่นใจว่าต้องไม่เกิด atypical reaction

การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

3. ปริมาณเชื้อแข่งขัน (Competitive flora) และ Background flora

- การเติมเชื้อแข่งขัน และ Background flora ต้องอยู่ในระดับที่ไม่ทำให้เกิด false negative
- การเติมเชื้อแข่งขัน และ Background flora ต้องไม่ก่อให้เกิด false positive
- ถ้าตัวอย่างทดสอบมีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ ต้องตรวจสอบว่า Background flora ไม่ส่งผลกระทบต่อการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย



Salmonella and Background flora

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่าง (ต่อ)

4. การเลือกชนิดตัวอย่าง (Natural contamination หรือ Artificial contamination)

- ต้องคำนึงถึง Homogeneity และ Stability
 - วิธีการที่ใช้รักษาตัวอย่างให้มีความคงตัว เช่น freeze-dried หรือ air dried
 - ตัวอย่างต้องถูกตรวจสอบถึงผลกระทบต่อปริมาณเชื้อเป้าหมายและ Background flora บางชนิดตัวอย่างอาจทำให้ลดปริมาณ recovery ของเชื้อที่เดิม เช่น ตัวอย่างที่มีไขมันสูง หรือมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- (บางครั้งต้องมีการแจ้งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้แก่ผู้ทดสอบทราบ)
- ตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา บางครั้งไม่จำเป็นต้องทำให้ปราศจากเชื้อก่อนใช้ แต่ต้องตรวจสอบ Background flora



Assigned Values and Target Standard Deviations for Proficiency Tests in Enumeration

proficiency test	$\hat{X}$ assigned value $\log_{10}$ cfu/g						target standard deviation	
	robust mean	mode	n number of data points	robust standard deviation $\hat{\sigma}$	sem standard error of mode	u uncertainty	derived from	σ_p $\log_{10}$ cfu/g
lactic acid bacteria	3.68		19	0.273		0.063	retrospective FEPAS® data	0.25
Enterobacteriaceae	3.62		43	0.204		0.031	retrospective FEPAS® data	0.25
coagulase positive staphylococci		4.11	41		0.044	0.044	retrospective FEPAS® data	0.25
aerobic plate count	4.64		45	0.192		0.029	retrospective FEPAS® data	0.25

APPENDIX II: Verification of Positive Qualitative Test Materials

target organism	level of target organism MPN/g
<i>Listeria monocytogenes</i> (chicken)	23.0 (5-94*) / 23.0 (5-94*)
<i>Listeria monocytogenes</i> (milk powder)	38.0 (9-104*) / 24.0 (4-99*)
<i>Campylobacter jejuni</i>	4.3 (0.9-18.1*) / 4.3 (0.9-18.1*)
<i>Salmonella</i> Cerro	46.0 (9-198*) / 46.0 (9-198*)
<i>Escherichia coli</i> O157 (beef)	7.5 (1.7-19.9*) / 4.3 (0.9-18.1*)
<i>Escherichia coli</i> O157 (milk)	75.0 (17-199*) / 46.0 (9-198*)

*confidence limits at >95%

Proficiency Test	Matrix	Target Organism	Background Flora
lactic acid bacteria	beef	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Enterobacteriaceae	milk powder	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
coagulase positive staphylococci	beef	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>E. coli</i> <i>P. putida</i>
aerobic plate count	milk powder	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Bacillus cereus</i>	not applicable
<i>L. monocytogenes</i> test material A	chicken	not applicable	<i>Listeria innocua</i> <i>B. cereus</i> <i>Pseudomonas mirabilis</i>
<i>L. monocytogenes</i> test material B	chicken	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i>
<i>L. monocytogenes</i> test material A	milk powder	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
<i>L. monocytogenes</i> test material B	milk powder	not applicable	<i>Listeria welchimeri</i> <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i>
<i>Campylobacter</i> spp. test material A	chicken	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>B. cereus</i> <i>P. mirabilis</i>
<i>Campylobacter</i> spp. test material B	chicken	not applicable	<i>B. cereus</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>Salmonella</i> spp. test material A	parsley	not applicable	<i>E. coli</i> <i>Citrobacter freundii</i>
<i>Salmonella</i> spp. test material B	parsley	<i>Salmonella</i> Cerro	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> O157	milk (dried)	<i>E. coli</i> O157	<i>B. subtilis</i>

การเตรียมตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

การตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ

1. การทดสอบเชิงปริมาณ อ้างอิงตาม ISO/IEC 17043 และ ISO 13528: 2005

2. การทดสอบเชิงคุณภาพ

- Present and absence methods

- Test by enumerating the spikes

- Can use MPN technique

(กรณีเลือกใช้ enumeration method ให้อ้างอิงตาม ISO/IEC 17043 และ ISO 13528:2005)

Specific equipments for freeze dry technology

Freeze dryer

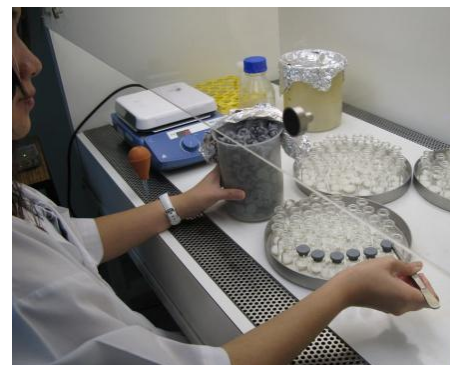


Specific equipments for freeze dry technology

Freezer or Deep freezer



Other Equipment & Apparatus



E.g. Coliform in water (MPN/100 ml)



How to prepare the samples?

How to study homogeneity and stability?

E.g. Coliform in water (MPN/100 ml)

How to prepare the samples?

Answer the questions

1. What is reference method that laboratory use?

- Normally they use AWWA

2. How many technique that can analyze and report in unit MPN/100 ml?

- Two techniques: portable water; 10 tube

Nonportable water; use 5-5-5 table

3. Which technique you can do and why?

- Can do MPN/100 ml (5-5-5)
- MPN/100 ml (5-5-5) is very easy to prepare PT sample because level of target microorganism contamination in water is not too low
- Very difficult if choose portable water (10 tube) because we must spike too low level of target microorganism in water (such as 10 cells in 100 ml of water)

E.g. Coliform in water (MPN/100 ml)



How to prepare the samples?

- **Choose matrix: water**
- **Choose container: bottle that it's size can pack in a foam box**
- **Choose target microorganism: *Enterobacter aerogenes* ATCC13048**
: Natural contamination from ice
- **Choose background flora: Natural contamination from ice**
- **Sample preparation documentation**
- **Homogeneity and stability plan**

E.g. Coliform in water (MPN/100 ml)

Study plan for homogeneity and stability study

Factor	Storage condition	No. of sample	No of replicate
A	4-10 ⁰ C, 72 hrs.	3	2
B	4-10 ⁰ C, 24 hrs. Foam box with ice*, 24 hrs and 4-10 ⁰ C, 24 hrs.	3	2
C	4-10 ⁰ C, 24 hrs. Foam box with ice*, 32 hrs and 4-10 ⁰ C, 16 hrs.	3	2
D	4-10 ⁰ C, 24 hrs. Foam box with ice* and keep in a car (trunk), 24 hrs and 4-10 ⁰ C, 24 hrs.	3	2
E	4-10 ⁰ C, 24 hrs. Foam box with ice* and keep in a car (trunk), 32 hrs and 4-10 ⁰ C, 16 hrs.	3	2
F	4-10 ⁰ C, 48 hrs.	3	2
G	4-10 ⁰ C, 7 days.	3	2

* Thermafreeze® Ice replacement, Large (ZMP-SCF400) (3 pieces/box)

Homogeneity and stability evaluation: result from factor A-E

Sample No.	Factor	Rep 1 MPN/100 ml	Rep 2 MPN/100 ml
1	A	790	330
2	A	490	280
3	A	490	310
4	B	220	330
5	B	220	490
6	B	230	330
7	C	280	490
8	C	330	490
9	C	1300	220
10	D	330	330
11	D	490	310
12	D	230	700
13	E	540	230
14	E	490	330
15	E	330	430

Homogeneity check

ANOVA Single factor

$F = 0.250$

$F_{\text{crit}} = 2.424$

$F < F_{\text{crit}}$ (Homogeneous)

ISO 13528:2005

$S_s = 0$

Stability check: t-Test

Compare condition B-E with A

Every factor $t_{\text{stat}} < t_{\text{crit}}$

(Stable)

Stability evaluation: result from factor F and G

Sample No.	Factor	Rep 1 MPN/100 ml	Rep 2 MPN/100 ml
1	F	790	330
2	F	490	280
3	F	490	310
4	G	220	330
5	G	220	490
6	G	230	330

Stability check: t-Test

$$t_{\text{stat}} = 1.958$$

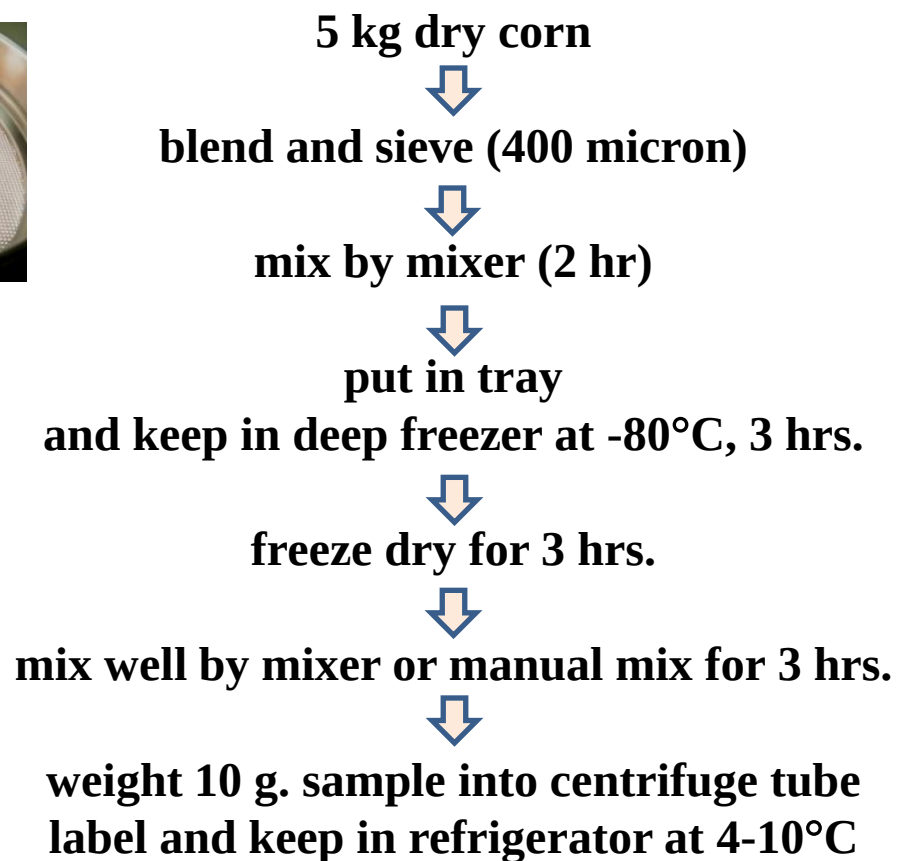
$$t_{\text{crit}} = 2.776$$

$$t_{\text{stat}} < t_{\text{crit}}$$

(Stable)

Sample Preparation

TPC, Yeast and Mold in Corn powder



Label and Record



สถิติสำหรับการประเมินผลทดสอบความชำนาญ

- **ISO 13528, 2005: Statistical methods for use in proficiency testing by Interlaboratory comparisons**
- **IUPAC, 2006: The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories**
- **ISO/TS 22117, 2010: Microbiology of food and animal feeding stuffs- Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison**

สำหรับการประเมิน Homogeneity, Stability, Assigned value และ Z-Score

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง

- สุ่มตัวอย่างทดสอบ 10 ตัวอย่าง ๆ ละ 2 ซ้ำ
(random sampling, random analytical order และ under repeatability condition)
- ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยสถิติที่เหมาะสม

1. ANOVA single factor

เกณฑ์การประเมิน $F < F_{critical}$

2. Between-Sample SD relative to evaluation interval (ISO 13528)

เกณฑ์การประเมิน

$$S_s \leq 0.3\hat{\sigma}$$

3. Between-portion variance (IUPAC:2006)

เกณฑ์การประเมิน

$$S_{sam}^2 \leq F_1 (0.3\hat{\sigma})^2 + F_2 S_{an}^2$$

การทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง

- สุ่มตัวอย่างทดสอบ 3 ตัวอย่าง ๆ ละ 2 ซ้ำ (repeatability)

- ประเมินความคงตัวของตัวอย่าง

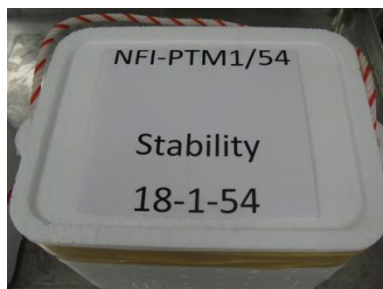
เกณฑ์การประเมิน

$$|\bar{x} - \bar{y}| \leq 0.3\hat{\sigma}$$

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบความคงตัว

$\hat{\sigma}$ คือ Standard deviation for proficiency assessment



Evaluation of $\hat{\sigma}$

วิธีการหาค่า $\hat{\sigma}$	คำอธิบายวิธีการ	วิธีการคำนวณ
1. Prescribed value	$\hat{\sigma}$ เป็นค่าที่กำหนดขึ้นจากความจำเป็นของงานทดสอบหรือกำหนดจากข้อกำหนดของกฎระเบียบต่างๆ เช่น การทดสอบ Aflatoxin มีค่า reproducibility coefficient of variation ไม่เกิน 50% ที่ปริมาณ Aflatoxin 10 $\mu\text{g/kg}$	เช่น ถ้าโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณ Aflatoxin ปนเปื้อน 10 $\mu\text{g/kg}$ ดังนั้น Reproducibility standard deviation ($\hat{\sigma}_R$) ของตัวอย่างไม่เกิน 5 $\mu\text{g/kg}$ ในกรณีนี้ $\hat{\sigma}$ เท่ากับ 5 $\mu\text{g/kg}$

Evaluation of $\hat{\sigma}$

วิธีการหาค่า $\hat{\sigma}$	คำอธิบายวิธีการ	วิธีการคำนวณ
2. Perception	การกำหนดค่า $\hat{\sigma}$ จากข้อมูลผลการทดสอบความชำนาญโปรแกรมที่ผ่านมา โดยข้อมูลผ่านการพิจารณาว่ามีความเหมาะสม เช่น การกำหนด %RSD ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ	การคำนวณค่า $\hat{\sigma}$ เท่ากับ $RSD \times \text{Assigned value}$

FEPAS protocol set at a value from previous scheme

$\hat{\sigma} = 0.25$ for microbiological scheme

FAPAS protocol set at a value by %RSD of PT sample

%RSD = 2 for pH

$$\hat{\sigma} = \text{RSD} \times \text{assigned value}$$

$$\begin{aligned} \text{if } \% \text{RSD} &= 2 \\ &= 0.02 \times 4.81 \\ &= 0.096 \end{aligned}$$

Sample No.	Result A	Result B
1	4.80	4.81
2	4.82	4.82
3	4.81	4.81
4	4.81	4.81
5	4.82	4.81
6	4.81	4.80
7	4.81	4.82
8	4.80	4.80
9	4.80	4.80
10	4.80	4.80
Mean	4.81	
S_s	0.006	
$0.3 \hat{\sigma}$	0.029	
$S_s \leq 0.3 \hat{\sigma}$	PASS	

Evaluation of $\hat{\sigma}$

วิธีการหาค่า $\hat{\sigma}$	คำอธิบายวิธีการ	วิธีการคำนวณ
3.General model	การคำนวณค่า $\hat{\sigma}$ จากสมการ Horwitz โดยเลือกใช้สมการที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง เหมาะกับโปรแกรมเชิงปริมาณ ซึ่งทราบค่าความเข้มข้น	คำนวณค่า $\hat{\sigma}$ ได้ตามสมการ 1 concentration < 120 ppb $\hat{\sigma}_R = 0.22c/mr$ 3.2 concentration ≥ 120 ppb d $\leq 13.8\%$ $\hat{\sigma}_R = 0.02c^{0.8495}/mr$ 3.3 concentration $> 13.8\%$ $\hat{\sigma}_R = 0.01c^{0.5}/mr$ เมื่อ c = concentration, i.e. the assigned value, expressed as a dimensionless mass ratio, e.g. 1 ppm $\equiv 10^{-6}$ or % $\equiv 10^{-2}$ mr = dimensionless mass ratio, e.g. 1 ppm $\equiv 10^{-6}$ or % $\equiv 10^{-2}$

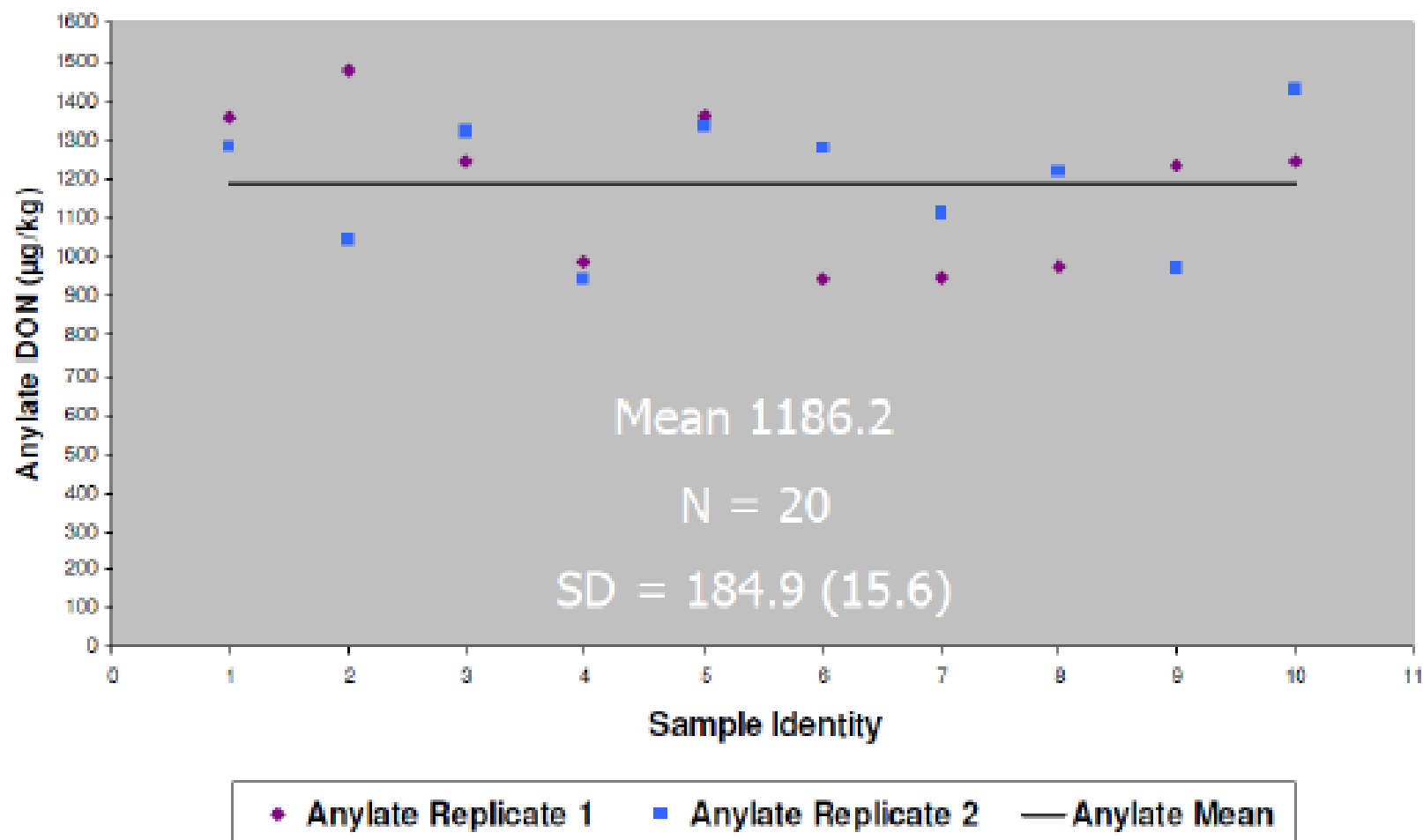
Evaluation of $\hat{\sigma}$

วิธีการหาค่า $\hat{\sigma}$	คำอธิบายวิธีการ	วิธีการคำนวณ
4. Results of precision experiment	คำนวณค่า $\hat{\sigma}$ จากความแม่นยำของผลการทดสอบ โดยวิธีการทดสอบของกลุ่มผู้เข้าร่วมเป็นวิธีที่เปรียบเทียบกับมาตรฐานแล้วและมีมาตรฐานระดับเดียวกัน	คำนวณค่า $\hat{\sigma}$ ได้ตามสมการ $\hat{\sigma} = \sqrt{\sigma_L^2 + (\sigma_r^2 / n)}$ $\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$ โดย σ_L คือ Between-laboratory standard deviation σ_R คือ Reproducibility standard deviation σ_r คือ Repeatability standard deviation

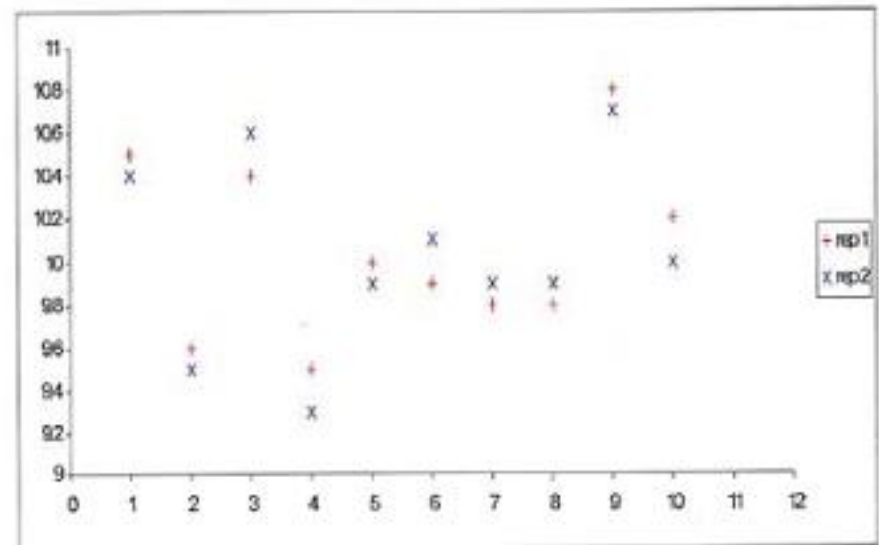
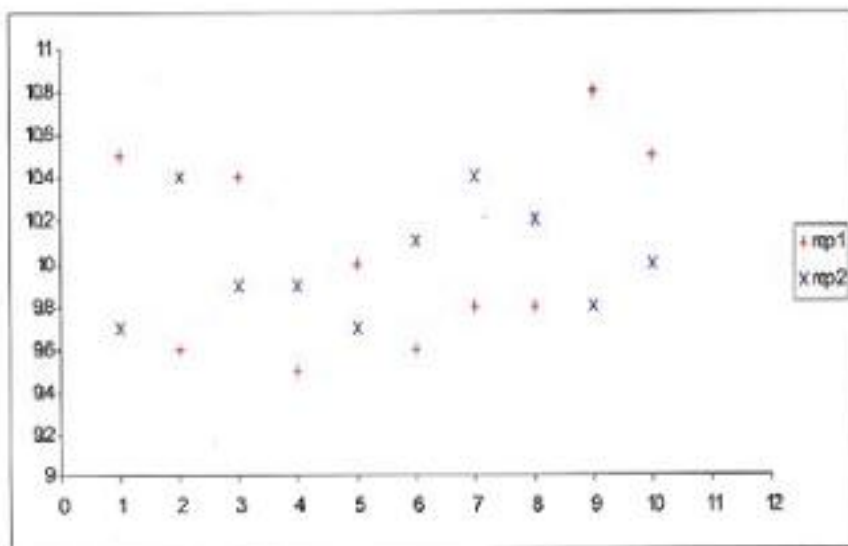
Evaluation of $\hat{\sigma}$

วิธีการหาค่า $\hat{\sigma}$	คำอธิบายวิธีการ	วิธีการคำนวณ
5. Data in round of proficiency testing scheme	คำนวณค่า $\hat{\sigma}$ จากผลทดสอบของกลุ่มผู้เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญในโปรแกรมนั้นๆ	คำนวณ $\hat{\sigma}$ ซึ่งคือค่า robust standard deviation (s^*) โดยวิธี algorithm A

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง



การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง

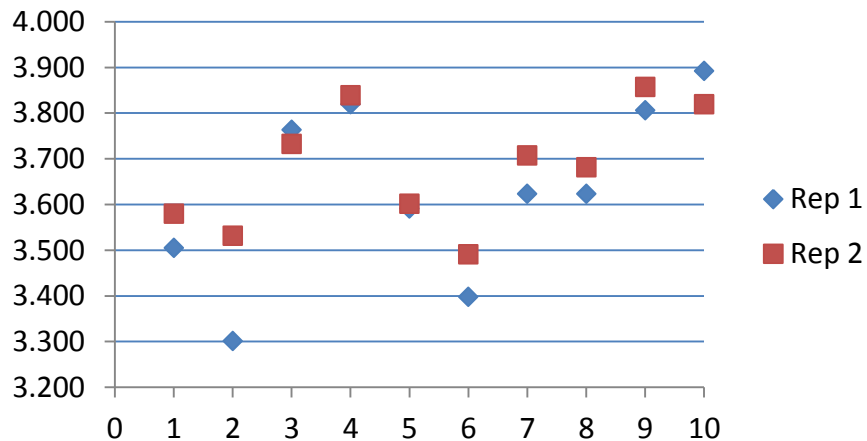


over-sensitive when repeatability is very good

under-sensitive when repeatability is poor

E.g. PT sample of microbiological scheme

Sample T1 batch 1



ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.4558	9	0.051	11.613	0.0003	3.020
Within Groups	0.0436	10	0.004			
Total	0.4994	19				

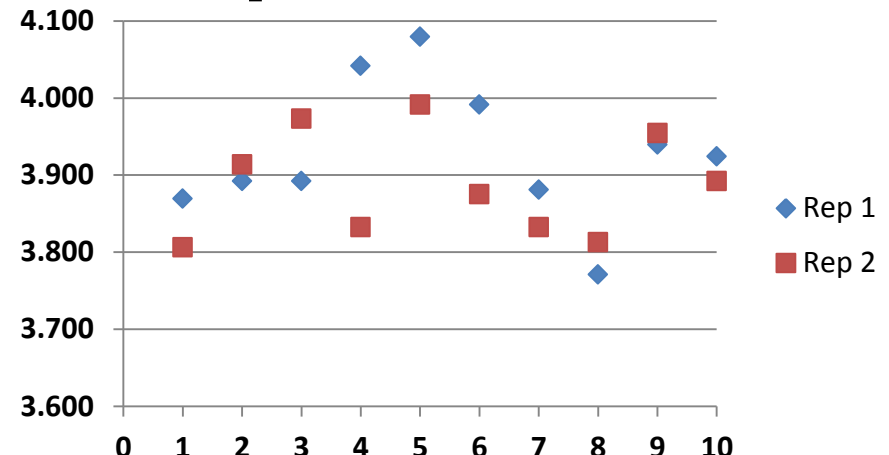
ISO13528 $S_s \leq 0.3 \hat{\sigma}$

$S_s = 0.152, \hat{\sigma}$ from previous round = 0.25

$0.3 \hat{\sigma} = 0.075$

$S_s > 0.3 \hat{\sigma}$

Sample T1 batch 2



ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.082	9	0.009	2.235	0.113	3.020
Within groups	0.041	10	0.004			
Total	0.122	19				

ISO13528 $S_s \leq 0.3 \hat{\sigma}$

$S_s = 0.050, \hat{\sigma}$ from previous round = 0.25

$0.3 \hat{\sigma} = 0.075$

$S_s < 0.3 \hat{\sigma}$

Homogeneity of sample T1 batch 1

Check outlier by Cochran's test (IUPAC, 2006)

Sample	Rep 1	Rep 2	D= rep 1 - rep2	D ²	
1	3.505	3.580	-0.075	0.006	
2	3.301	3.531	-0.230	0.053	D²max
3	3.763	3.732	0.031	0.001	
4	3.820	3.839	-0.019	0.000	
5	3.591	3.602	-0.011	0.000	
6	3.398	3.491	-0.093	0.009	
7	3.623	3.708	-0.084	0.007	
8	3.623	3.681	-0.058	0.003	
9	3.806	3.857	-0.051	0.003	
10	3.892	3.820	0.073	0.005	
sumD²				0.087	

Outlier

$$Cochran's test = D^2 \max / SumD^2 = 0.609$$

$$Critical\ value\ 95\% \quad n=10 \quad 0.602$$

Conclusion for outlier of analysis Result pair of sample 2 is outlier

Delete sample 2, $S_s = 0.135$, $\hat{\sigma}$ from previous round = 0.25

$$0.3\hat{\sigma} = 0.075$$

$$S_s > 0.3\hat{\sigma}$$

Homogeneity of sample T1 batch 2

Check outlier by Cochran's test (IUPAC, 2006)

Sample	Rep 1	Rep 2	D= rep 1 - rep2	D ²
1	3.869	3.806	0.063	0.004
2	3.892	3.914	-0.022	0.000
3	3.892	3.973	-0.081	0.007
4	4.041	3.833	0.209	0.044 D²max
5	4.079	3.991	0.088	0.008
6	3.991	3.875	0.116	0.013
7	3.881	3.833	0.048	0.002
8	3.771	3.813	-0.042	0.002
9	3.940	3.954	-0.015	0.000
10	3.924	3.892	0.032	0.001
sumD ²				0.081

Outlier

$$\text{Cochran's test} = D^2 \text{ max} / \text{Sum} D^2 = 0.537$$

Critical value 95% n=10 0.602

Conclusion for outlier of analysis

No outlier

ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (ISO 13528:2005)

Between sample standard deviation (S_s)

$$S_s \leq 0.3\hat{\sigma}$$

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2 / 2)}$$

S_x : Standard deviation of sample average

$$\sqrt{\sum (X_{tr} - \bar{X}_{tr})^2 / (g - 1)} \quad : \quad X_{tr} = (X_{t,1} + X_{t,2}) / 2 ; X_{tr} : \text{sample average}$$

t : represent the sample

r : represent the replicate measurement

g : number of sample tested in a homogeneity check

$$\bar{X}_{tr} = \sum \bar{X}_{tr} / g \quad ; \quad \bar{X}_{tr} : \text{general average}$$

ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (ISO 13528:2005)

Between sample standard deviation (S_s)

S_w : Within-samples standard deviation

$$S_w = \sqrt{\sum W_t^2 / (2g)} \quad : \quad W_t = |X_{t,1} - X_{t,2}|$$

g = Number of samples tested in a homogeneity check

$$W_t = |X_{t,1} - X_{t,2}| \quad ; \quad W_t : \text{between-test-portion ranges}$$

ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (ISO/TS 22117:2010, IUPAC 2006)

$$S_{sam}^2 \leq F_1 (0.3\hat{\sigma})^2 + F_2 S_{an}^2$$

1. คำนวณหา Between-portion variance (S_{sam}^2)

$$S_{sam}^2 = (\bar{S}_b - \bar{S}_w) / 2$$

$\bar{S}_w$: mean sum of squares of within sample variation

$\bar{S}_b$: (variance of $\bar{S}_w$) / 2

2. คำนวณหา $\bar{S}_w$

$$\bar{S}_w = \sum D_i^2 / 2m \quad m : \text{จำนวนตัวอย่างทดสอบ}$$

3. คำนวณหา $\bar{S}_b$

$$\bar{S}_b = (\text{variance of } \bar{S}_w) / 2$$

$$\text{variance of } \bar{S}_w = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m - 1)$$

S_i : ผลรวมของผลการทดสอบแต่ละตัวอย่าง

$\bar{S}$: ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดสอบ

m : จำนวนตัวอย่างทดสอบ

ค่าผลต่าง (D_i), ผลรวม (S_i) และ ผลต่างกำลังสอง (D_i^2)

$$S_{sam}^2 \leq F_1 (0.3\hat{\sigma})^2 + F_2 S_{an}^2$$

เมื่อทำการทดสอบ 10 ตัวอย่าง $F_1 = 1.88$ $F_2 = 1.01$

โดย $S_{an}^2 = \bar{S}_w$

การทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง

Sample No.	<i>E. coli</i> (log ₁₀ cfu/g)			
	Homogeneity (x)		Stability (y)	
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
1	3.544	3.892	3.799	3.785
2	3.908	3.973	3.623	3.653
3	3.833	3.799	3.881	3.929
4	3.724	3.763	3.653	3.580
5	3.851	3.886	3.568	3.532
6	3.756	3.643	-	-
7	3.771	3.763	-	-
8	3.820	3.699	-	-
9	3.462	3.633	-	-
10	3.462	3.778	-	-
mean	3.748		3.700	
$ \bar{x} - \bar{y} $			0.048	
$\hat{\sigma}$			0.467	
$0.3\hat{\sigma}$			0.140	
$ \bar{x} - \bar{y} \leq 0.3\hat{\sigma}$			Stable	

Proficiency testing assessment

- Microbiological scheme

- Detection scheme (Detected/Not detected)

✓เกณฑ์การประเมิน

ห้องปฏิบัติการจะได้ผลผ่านการประเมินเมื่อทดสอบตัวอย่าง
ได้ผลถูกต้องทุกตัวอย่าง ดังนี้

กรณี test sample result เป็น not detected ห้องปฏิบัติการ
ต้องรายงาน not detected

กรณี test sample result เป็น detected ห้องปฏิบัติการ
ต้องรายงาน detected

Evaluation of Z-Score

- โปรแกรมทดสอบทางเคมี

$$Z - Score = \frac{x - X}{\hat{\sigma}}$$

- โปรแกรมทดสอบทางจุลชีววิทยา

$$Z - Score = \frac{\log_{10} x - \log_{10} X}{\hat{\sigma}}$$

X คือ ผลทดสอบของห้องปฏิบัติการ (Participant's reported result)

X คือ ค่ากำหนด (Assigned value)

$\hat{\sigma}$ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ
(Standard deviation for proficiency assessment)

Evaluation of Z' -Score

- โปรแกรมทดสอบที่ใช้วัสดุอ้างอิงรับรองเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

$$Z' - Score = \frac{x - X}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

X คือ ผลทดสอบของห้องปฏิบัติการ (Participant's reported result)

X คือ ค่ากำหนด (Assigned value)

$\hat{\sigma}$ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ

(Standard deviation for proficiency assessment)

u_x คือ ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด

(Standard uncertainty of the assigned value)

การหาค่า Assigned value (ISO13528:2005)

การคำนวณหาค่า Assigned value ตามวิธี Robust analysis: Algorithm A

- ✓ เรียงข้อมูลผลการทดสอบจากน้อยไปมาก
- ✓ คำนวณหาค่า x^* ซึ่งคือ median ของข้อมูลผลการทดสอบ
- ✓ คำนวณหาค่า s^* ซึ่งมีค่า $s^* = 1.483 \times \text{median} |x_i - x^*|$; x_i คือ ผลทดสอบ
- ✓ ปรับค่าผลทดสอบที่อยู่นอกช่วง lower limit ถึง upper limit
 - คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ $\delta = 1.5s^*$
 - คำนวณค่า lower limit มีค่าเท่ากับ $x^* - \delta$
 - คำนวณค่า upper limit มีค่าเท่ากับ $x^* + \delta$
 - เปลี่ยนค่าผลการทดสอบที่มีค่าน้อยกว่า lower limit ที่คำนวณได้ ให้มีค่าเท่ากับค่า lower limit
 - เปลี่ยนค่าผลการทดสอบที่มีค่ามากกว่า upper limit ที่คำนวณได้ ให้มีค่าเท่ากับค่า upper limit

การคำนวณหาค่า Assigned value ตามวิธี Robust analysis: Algorithm A

- ✓ คำนวณหาค่า x^* โดยมีค่าเท่ากับ ค่าเฉลี่ย และคำนวณหาค่า new s^* โดย

$$\text{new } s^* = 1.134 \times \sqrt{\sum (x_i^* - x^*)^2 / (P-1)}$$

- ✓ ให้ปรับค่า lower limit และ upper limit จน new s^* คงที่

- ✓ เมื่อ new s^* คงที่

ค่า x^* (robust mean) คือ ค่า assigned value ที่ได้จากการทดสอบ

ของผู้เข้าร่วมโปรแกรม

new s^* คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบของผู้เข้าร่วมโปรแกรม

ซึ่งให้เป็น ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการประเมินผลการทดสอบ
ความชำนาญ

Evaluation of Standard uncertainty of the assigned value, u_x

$$u_x = 1.25 \times \frac{s^*}{\sqrt{p}}$$

s^* คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโรบัสต์ (คำนวณโดยวิธี Algorithm A)

p คือ จำนวนข้อมูลผลการทดสอบ

การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง

2 ห้องปฏิบัติการ

1. ใช้ตัวอย่างทดสอบที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน
2. กรณีประเมินผลการทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้วย t-Test
 - 2.1 ทำการทดสอบตัวอย่างห้องปฏิบัติการละ 5 ตัวอย่าง
 - 2.2 ประเมินผลการทดสอบด้วย t-Test

การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง

2 ห้องปฏิบัติการ

การประเมินด้วย t-Test

1. วิเคราะห์ F-test Two sample for variance โดยกำหนด $\text{Alpha} = 0.025$

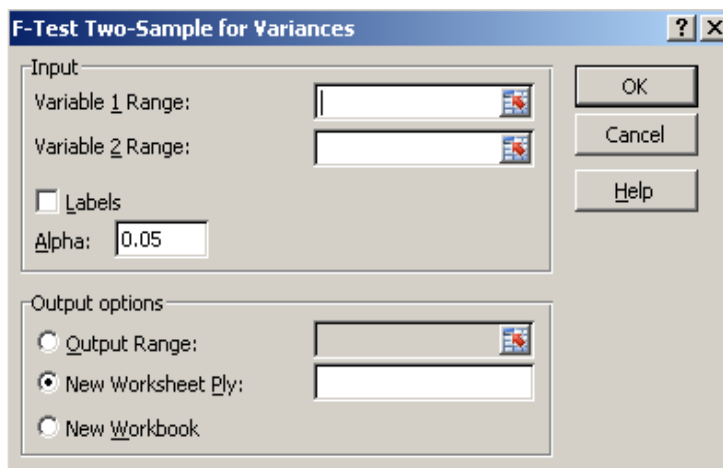
เปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้กับค่า F critical

- ถ้าค่า F ที่คำนวณได้ $< F \text{ critical}$ แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน ให้

ดำเนินการทดสอบ t-Test: Two-sample assuming equal variances

- ถ้าค่า F ที่คำนวณได้ $> F \text{ critical}$ แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวนแตกต่างกัน ให้ดำเนินการ

ทดสอบ t-Test: Two-sample assuming unequal variances



การ Input ข้อมูล

Variable 1 Range: Input ชุดข้อมูลที่มี Varian สูงกว่า

Variable 2 Range: Input ชุดข้อมูลที่มี Varian ต่ำกว่า

ใช้ $\text{Alpha} = 0.025$

การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง

2 ห้องปฏิบัติการ

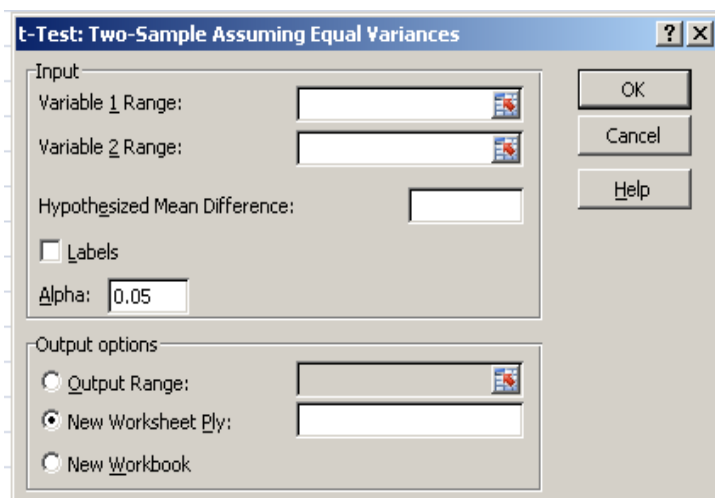
การประเมินด้วย t-Test

2. วิเคราะห์ t-Test: Two-sample assuming equal variances หรือ unequal variances กำหนด

Alpha = 0.05

เปรียบเทียบค่า t ที่คำนวณได้กับค่า t critical two tail

- ถ้าค่า t ที่คำนวณได้ < t critical แสดงว่าข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ถ้าค่า t ที่คำนวณได้ > t critical แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



การ Input ข้อมูล

Variable 1 Range: Input ชุดข้อมูลที่มี Varian สูงกว่า

Variable 2 Range: Input ชุดข้อมูลที่มี Varian ต่ำกว่า

ใช้ Alpha = 0.05

การประเมินด้วย t-Test

ข้อมูลผลการทดสอบ

Result	Result
Lab A	Lab B
(%)	(%)
3.44	3.44
3.44	3.44
3.44	3.45
3.45	3.44
3.44	3.45

F-Test Two-Sample for Variances

	Variable	
	Variable 1	2
Mean	3.444	3.442
Variance	3E-05	2E-05
Observations	5	5
df	4	4
F	1.5	
P(F<=f) one-tail	0.352	
F Critical one-tail	9.604529885	

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Variable	
	1	2
Mean	3.444	3.442
Variance	3E-05	2E-05
Observations	5	5
Pooled Variance	2.5E-05	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.632	
P(T<=t) one-tail	0.272	
t Critical one-tail	1.860	
P(T<=t) two-tail	0.545	
t Critical two-tail	2.306	

$t_{stat} < t_{critical}$ แสดงว่าผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ
 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การประเมินด้วย t-Test

ข้อมูลผลการทดสอบ

Result	Result
Lab A	Lab B
(%)	(%)
0.59	0.61
0.59	0.61
0.60	0.61
0.60	0.61
0.60	0.61

F-Test Two-Sample for Variances

	Variable 1	Variable 2
Mean	0.596	0.61
Variance	3E-05	0
Observatio		
ns	5	5
df	4	4
F	65535	
P(F<=f)		
one-tail	#NUM!	
F Critical		
one-tail	9.60453	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Variable 1	Variable 2
Mean	0.596	0.61
Variance	3E-05	0
Observations	5	5
Hypothesized		
Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-5.71548	
P(T<=t) one-tail	0.002318	
t Critical one-tail	2.131847	
P(T<=t) two-tail	0.004636	
t Critical two-tail	2.776445	

$t_{stat} > t_{critical}$ แสดงว่าผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การประเมินด้วย Z-Score

Homogeneity: %Acidity

Sample	Result A	Result B
1	0.59	0.59
2	0.59	0.59
3	0.59	0.60
4	0.60	0.60
5	0.60	0.60
6	0.60	0.60
7	0.60	0.60
8	0.60	0.60
9	0.60	0.60
10	0.59	0.60

Average = 0.60

Ss = 0.004

$\hat{\sigma} = 0.026$

$0.3 \hat{\sigma} = 0.008$

$S_s \leq 0.3 \hat{\sigma}$

Stability

0.59

0.59

0.60

0.60

0.60

Average = 0.60

$|\bar{x} - \bar{y}| \leq 0.3 \hat{\sigma}$

$$Z - Score = \frac{x - X}{\hat{\sigma}}$$

$$\hat{\sigma} = 0.02c^{0.8495}/mr$$

$$\hat{\sigma} = (0.02 * ((0.6 * 10^{(-2)})^{0.8495})) / 10^{(-2)}$$

$$\begin{aligned} Z-Score &= (0.61 - 0.60) / 0.026 \\ &= -0.4 \end{aligned}$$

Thank you



pt.nfi.or.th

pt@nfi.or.th

APPENDIX 1: RECOMMENDED PROCEDURE FOR TESTING A MATERIAL FOR SUFFICIENT HOMOGENEITY

A1.1 Procedure

1. Prepare the whole of the bulk material in a form that is thought to be homogeneous, by an appropriate method.
2. Divide the material into the containers that will be used for dispatch to the participants.
3. Select a minimum of 10 containers strictly at random.
4. Separately homogenize the contents of each of the m selected containers and take two test portions from each.
5. Analyze the $2m$ test portions in a random order under repeatability conditions by an appropriate method. The analytical method used must be sufficiently precise to allow a satisfactory estimation of s_{sam} . If possible, $\sigma_{\text{an}} < 0.5\sigma_{\text{p}}$.

The first step is to examine the data for pathologies. Such a check could be made visually on a simple plot of the results vs. sample number, searching for such diagnostic features as: (a) trends or discontinuities; (b) nonrandom distribution of differences between first and second test results; (c) excessive rounding; and (d) outlying results within samples.

If all is well, we use the data to estimate the analytical and sampling variances. If a program to perform a one-way analysis of variance is available, this may be used. Alternatively, a full calculation scheme is given below.

A1.2 Statistical methods

A1.2.1 Cochran test procedure for duplicate results

Calculate the sum, S_p , and difference, D_i , of each pair of duplicates, for $i = 1, \dots, m$.

Calculate the sum of squares S_{DD} of the m differences from

$$S_{DD} = \sum_m D_i^2$$

Cochran's test statistic is the ratio of D_{max}^2 , the largest squared difference to this sum of squared differences

$$C = \frac{D_{\text{max}}^2}{S_{DD}}$$

Calculate the ratio and compare it with the appropriate critical value from tables. Table 1 gives values of the critical values for 95 and 99 % confidence for m between 7 and 20 pairs.

Results for Cochran outlying pairs detected at the 95 % or higher level of confidence should always be inspected closely for evidence of transcription or other errors in the analysis and appropriate action taken if any errors are found. An outlying pair should not be rejected unless it is significant at the 99 % level or irremediable analytical procedure errors are found. A single Cochran outlier at the 99 % level should be excluded from the ANOVA unless there is reason to the contrary (see Section 3.11).

A1.2.2 Test for significant inhomogeneity

Use the same sum of squared differences to calculate

$$s_{\text{an}}^2 = \Sigma D_i^2 / 2m$$

Calculate the variance V_S of the sums S_i

$$V_S = \Sigma (S_i - \bar{S})^2 / (m - 1)$$

where $\bar{S} = (1/m)\Sigma S_i$ is the mean of the S_i .

Calculate the sampling variance s_{sam}^2 as

$$s_{\text{sam}}^2 = (V_S/2 - s_{\text{an}}^2)/2$$

or as $s_{\text{sam}}^2 = 0$ if the above estimate is negative.

If a program for one-way analysis of variance is available, the quantities $V_S/2$ and s_{an} above may be extracted from the analysis of variance table as the "between" and "within" mean squares, respectively.

Calculate the allowable sampling variance σ_{all}^2 as

$$\sigma_{\text{all}}^2 = (0.3\sigma_p)^2$$

where σ_p is the standard deviation for proficiency assessment.

Taking the values of F_1 and F_2 from Table 2, calculate the critical value for the test as $c = F_1 \sigma_{\text{all}}^2 + F_2 s_{\text{an}}^2$

If $s_{\text{sam}}^2 > c$, there is evidence (significant at the 95 % level of confidence) that the sampling standard deviation in the population of samples exceeds the allowable fraction of the target standard deviation, and the test for homogeneity has failed.

If $s_{\text{sam}}^2 < c$, there is no such evidence, and the test for homogeneity has been passed.

A1.2.3 Tables of critical values for homogeneity testing

Table 1 Critical values for the Cochran test statistic for duplicates.

m	95 %	99 %
7	0.727	0.838
8	0.68	0.794
9	0.638	0.754
10	0.602	0.718
11	0.57	0.684
12	0.541	0.653
13	0.515	0.624
14	0.492	0.599
15	0.471	0.575
16	0.452	0.553
17	0.434	0.532
18	0.418	0.514
19	0.403	0.496
20	0.389	0.480

Table 2 Factors F_1 and F_2 for use in testing for sufficient homogeneity.

m^*	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
F_1	1.59	1.60	1.62	1.64	1.67	1.69	1.72	1.75	1.79	1.83	1.88	1.94	2.01	2.10
F_2	0.57	0.59	0.62	0.64	0.68	0.71	0.75	0.80	0.86	0.93	1.01	1.11	1.25	1.43

* m is the number of samples that have been measured in duplicate.

The two constants in Table 2 are derived from standard statistical tables as $F_1 = \chi^2_{m-1,0.95}/(m-1)$, where $\chi^2_{m-1,0.95}$ is the value exceeded with probability 0.05 by a chi-squared random variable with $m-1$ degrees of freedom, and $F_2 = (F_{m-1,m,0.95} - 1)/2$ where $F_{m-1,m,0.95}$ is the value exceeded with probability 0.05 by a random variable with an F -distribution with $m-1$ and m degrees of freedom.

A1.3 Example instructions for laboratories testing for sufficient homogeneity

The laboratory should be experienced in the analytical method used.

- Select the $m \geq 10$ distribution units strictly at random from the complete set. This must be done in a formal way, by assigning a sequential number to the units, either explicitly (by labeling them), or implicitly (e.g., by their position in an array). Make the selection by use of random numbers from a table or generated (with a new seed each time) by a computer package (e.g., Microsoft Excel). It is not acceptable to select the units in any other way (e.g., by shuffling them). Do not use a random sequence previously used.
- Homogenize the contents of each distribution unit in an appropriate manner (e.g., in a blender) and from each weigh out two test portions. Label the test portions as shown.

Sequential code of distribution unit	Label of first test portion	Label of second test portion
1	1.1	1.2
2	2.1	2.2
3	3.1	3.2
.	.	.
.	.	.
m	$m.1$	$m.2$

- Sort the 20 test portions into a random order and carry out all analytical operations on them in that order. Again, random number tables or a computer package must be used to generate a new random sequence. An example random sequence (not to be copied) is 7.1 3.1 5.2 5.1 10.2 1.1 2.1 9.2 8.2 1.2 4.1 2.2 9.1 10.1 7.2 3.2 8.1 6.1 4.2 6.2
- Conduct the analysis if at all possible under repeatability conditions (i.e., in one run) or, if that is impossible, in successive runs with as little change as possible to the analytical system, using a method that has a repeatability standard deviation of less than $0.5\sigma_p$. Record results if possible with as many significant figures as those required for $0.01\sigma_p$.
- Return the 20 analytical results, including the labels, in the run order used.

Use σ_{r1} in place of σ_r in the guideline for choosing the number of replicate measurements, Equation (2).

- c) Include the between-samples standard deviation in the standard deviation for proficiency testing, by calculating $\hat{\sigma}$ as

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}_1^2 + s_s^2} \quad (\text{B.3})$$

where $\hat{\sigma}_1$ is the standard deviation for proficiency testing that does not include any allowance for the heterogeneity of the samples.

B.3 Formulae for homogeneity check

The data from a homogeneity check are represented by:

$x_{t,k}$

where

t represents the sample ($t = 1, 2, \dots, g$)

k represents the test portion ($k = 1, 2$)

Define the sample averages as:

$$\bar{x}_{t..} = (x_{t,1} + x_{t,2}) / 2 \quad (\text{B.4})$$

and the between-test-portion ranges as:

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (\text{B.5})$$

Calculate the general average:

$$\bar{x}_{...} = \sum \bar{x}_{t..} / g \quad (\text{B.6})$$

the standard deviation of sample averages:

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t..} - \bar{x}_{...})^2 / (g - 1)} \quad (\text{B.7})$$

and the within-samples standard deviation:

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)} \quad (\text{B.8})$$

where the summations are over samples ($t = 1, 2, \dots, g$).

Finally, calculate the between-samples standard deviation as:

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)} \quad (\text{B.9})$$

NOTE Instead of using ranges, one could use between test portion standard deviations such as $s_t = w_t / \sqrt{2}$.

Annex C (normative)

Robust analysis

C.1 Robust analysis: Algorithm A

This algorithm yields robust values of the average and standard deviation of the data to which it is applied.

NOTE 1 Algorithms A and S given in this annex are reproduced from ISO 5725-5.

NOTE 2 Robustness is a property of the estimation algorithm, not of the estimates it produces, so it is not strictly correct to call the averages and standard deviations calculated by such an algorithm robust. However, to avoid the use of excessively cumbersome terminology, the terms "robust average" and "robust standard deviation" should be understood in this International Standard to mean estimates of the population mean or of the population standard deviation calculated using a robust algorithm.

Denote the p items of data, sorted into increasing order, by:

$$x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$$

Denote the robust average and robust standard deviation of these data by x^* and s^* .

Calculate initial values for x^* and s^* as:

$$x^* = \text{median of } x_i \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (\text{C.1})$$

$$s^* = 1,483 \text{ median of } |x_i - x^*| \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (\text{C.2})$$

Update the values of x^* and s^* as follows. Calculate:

$$\delta = 1,5s^* \quad (\text{C.3})$$

For each x_i ($i = 1, 2, \dots, p$), calculate:

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta, & \text{if } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta, & \text{if } x_i > x^* + \delta \\ x_i, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (\text{C.4})$$

Calculate the new values of x^* and s^* from:

$$x^* = \sum x_i^* / p \quad (\text{C.5})$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\sum (x_i^* - x^*)^2 / (p - 1)} \quad (\text{C.6})$$

where the summation is over i .

The robust estimates x^* and s^* may be derived by an iterative calculation, i.e. by updating the values of x^* and s^* several times using the modified data, until the process converges. Convergence may be assumed when there is no change from one iteration to the next in the third significant figure of the robust standard deviation and of the equivalent figure in the robust average. This is a simple method to program on a computer.

For the variation between units of one batch of TM, the Poisson distribution is the theoretical smallest possible variation that could be achieved. However, overdispersion is expected and $T_2/(I-1)$ is mostly larger than 1 (Reference [12]). An acceptable variation between units of a batch of TM is $T_2/(I-1) \leq 2$.

EXAMPLE

Given the following data:

unit:	(duplicate) counts:	
1	$z_{11} = 45$	$z_{12} = 49$
2	$z_{21} = 33$	$z_{22} = 42$
3	$z_{31} = 40$	$z_{32} = 42$
$I = 3$ (three units)		
$J = 2$ (two replicates)		
	$z_{1j}/J = (45 + 49)/2 = 94/2 = 47$	
	$z_{2j}/J = (33 + 42)/2 = 75/2 = 37,5$	
	$z_{3j}/J = (40 + 42)/2 = 82/2 = 41$	

$$T_1 = \frac{(45-47)^2}{47} + \frac{(49-47)^2}{47} + \frac{(33-37,5)^2}{37,5} + \frac{(42-37,5)^2}{37,5} + \frac{(40-41)^2}{41} + \frac{(42-41)^2}{41}$$

$$= 0,085 + 0,085 + 0,54 + 0,54 + 0,024 + 0,024$$

$$= 1,298$$

T_1 should follow a χ^2 -distribution with $I(J-1) = 3 \times (2-1) = 3$ degrees of freedom.

Tested two-sided at the 95 % confidence level, the lower and upper limit for this distribution are, with 3 degrees of freedom, 0,22 and 9,3, respectively. The calculated T_1 value (1,298) follows these criteria.

$$\sum z_{ij} = 45 + 49 + 33 + 42 + 40 + 42 = 251$$

$$\sum z_{ij}/I = 251/3 = 83,7$$

$$T_2 = \frac{(94-83,7)^2}{83,7} + \frac{(75-83,7)^2}{83,7} + \frac{(82-83,7)^2}{83,7}$$

$$= 1,268 + 0,904 + 0,034$$

$$= 2,206$$

Accepted variation for the batch is: $T_2/(I-1) \leq 2$.

Here $T_2/(I-1) = 2,206/(3-1) = 1,103$ and thus follows the criteria for acceptability of the batch.

B.2 Test for sufficient homogeneity

This test is recommended for cases where larger numbers of organisms (more than 35 to 40 cfu per plate) are present in portions of the test material and a target standard deviation, σ_p , that describes the performance expected of PT scheme participants is available. It is based on the "sufficient homogeneity" test of Reference [11].

Given a set of test material portions analysed in duplicate with results expressed in log units, the test is passed if the between-portion variance, s_{sam}^2 , satisfies Condition (B.5):

$$s_{\text{sam}}^2 \leq F_1(0,3\sigma_p)^2 + F_2s_{\text{an}}^2 \quad (\text{B.5})$$

where s_{an}^2 is the analytical variance. This test is less likely than that of $T_1 - T_2$ to lead to the rejection of a test material that is not perfectly homogenous (analytical results follow the Poisson distribution), but is sufficiently homogenous to be used in a proficiency test round with a target standard deviation of σ_p . This is because materials are accepted unless it is shown with high confidence (95 %) that the fitness for purpose criterion of $\sigma_{\text{sam}} > 0,3 \sigma_p$, where σ_{sam} is the standard deviation of which s_{sam} is an estimate.

EXAMPLE

Given quantitative results from the duplicate analysis of 10 test material portions, calculate the difference (D) and sum (S) and the square of D (D^2) of the decimal logarithm of each set of results (Table 1).

Portion	Analysis 1	Analysis 2	Log analysis 1	Log analysis 2	D	S	D^2
1	35	51	1,544 1	1,707 6	-0,163 5	3,251 6	0,026 733
2	52	46	1,716 0	1,662 8	0,053 2	3,378 8	0,002 835
3	35	33	1,544 1	1,518 5	0,025 6	3,062 6	0,000 653
4	53	38	1,724 3	1,579 8	0,144 5	3,304 1	0,020 878
5	30	40	1,477 1	1,602 1	-0,124 9	3,079 2	0,015 610
6	33	30	1,518 5	1,477 1	0,041 4	2,995 6	0,001 713
7	41	60	1,612 8	1,778 2	-0,165 4	3,390 9	0,027 346
8	35	55	1,544 1	1,740 4	-0,196 3	3,284 4	0,038 532
9	68	67	1,832 5	1,826 1	0,006 4	3,658 6	0,000 041
10	52	60	1,716 0	1,778 2	-0,062 1	3,494 2	0,003 862

Calculate the sum of D^2 and divide it by twice the number of portions. This is the mean sum of squares of within sample variation, $\bar{s}_w$.

In this case, $\bar{s}_w = 0,138\ 2/20 = 0,006\ 91$.

Calculate the variance of $\bar{s}_w$ and divide it by two. This is equal to $\bar{s}_b$.

In this case, $\bar{s}_b = 0,042\ 24/2 = 0,021\ 12$

Then $s_{\text{an}}^2 = \bar{s}_w$ and $s_{\text{sam}}^2 = (\bar{s}_b - \bar{s}_w)/2$

In this case, $s_{\text{an}}^2 = 0,006\ 91$ and $s_{\text{sam}}^2 = (0,021\ 12 - 0,006\ 91)/2 = 0,007\ 104$

Values for F_1 and F_2 depend on the number of portions examined in the test. For 10 portions $F_1 = 1,88$ and $F_2 = 1,01$ (values for other numbers of portions may be found in Reference [11]).

If the target standard deviation to be applied to the proficiency test results, σ_p , is equal to 0,25 $\log_{10}$ units then

$$F_1(0,3\sigma_p)^2 + F_2s_{\text{an}}^2 = 1,88 \times (0,3 \times 0,25)^2 + 1,01 \times 0,006\ 91 = 0,017\ 55$$

This value is larger than s_{sam}^2 (0,007 104). Hence Condition (B.5) is satisfied and the test material is sufficiently homogenous.