

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล นันทพัชร ลินทรต้นศิริกุล
ณัฐพล เลียงเพชร และ ณัฐญา แสงสว่าง

บทคัดย่อ

จากปัญหาเรื่องการระบาดของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ในทั่วโลก จึงต้องมีการหาไพรเมอร์ (primer) และ โพรบ (probe) เพื่อใช้ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้คือ เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ Limit of Detection (LOD) ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นของหมู โดยเทคนิค Real-time PCR ใช้วิธีตาม ISO/TS 20224-3: 2020 จากผลการทดลอง ตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นของหมูในอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคทั้งหมด 41 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.09% w/w โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09% w/w ในการตรวจพบคือ 40

คำสำคัญ : เนื้อและกระดูกป่น, Real-time PCR, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Meat and Bone meal of Porcine Detection in Animal Feeds by Real-Time PCR

Wantana Jantaramongkon, Nuntaschaporn Lindratsirikul
Nattaphol Liangpetch and Nattaya Saengsawang

Abstract

There was a problem of spreading Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) around the worldwide. Consequently, having more primer and probe to detect meat and bone meal in ruminant feed. This research aims to study was analyzed Limit of Detection (LOD) in the detection of meat and bone meal of pork in cow feed by Real Time PCR technique. The Real-Time PCR techniques are follows by ISO/TS 20224-3: 2020. From the results, Porcine detection in the total of feed samples were 41 samples, the Limit of Detection (LOD) is 0.09% w/w which the highest Cp value at 40.

Keywords: Meat and Bone meal (MBM), Real-time PCR, animal feeds

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล นันทัชพร ลินทรรัตนศิริกุล ณัฐพล เลียงเพ็ชร และ ณัฐญา แสงสว่าง

บทนำ

โรค Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารสัตว์ และเกิดการระบาดในปี ค.ศ.1986 ทำให้ European Union ได้ออกกฎหมายบังคับ Regulation (EC) No. 999/2001, Regulation (EC) NO. 1774/2002 และ Regulation (EC) No.1234/2003 โดยมีการกำหนดห้ามนำ โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Proteins ,PAPs) ที่รวมทั้งเนื้อและกระดูกป่น (Meat and Bone meal, MBM) มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ เพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ จากงานวิจัยของ Van Raamsdonk et al., 2007 กล่าวว่า ได้มีวิธีการตรวจหา โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Proteins ,PAPs) อย่างเป็นทางการ ใน compound feed ในยุโรป ด้วยวิธีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Classical Light microscopy) แต่วิธีนี้ถูกจำกัดเพราะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางคุณลักษณะในแต่ละสายพันธุ์ (species) ได้

โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animals Protein ,PAPs) เป็นแหล่งกรดอะมิโนที่จำเป็นและมีคุณค่าทางโปรตีนสูง มีการนำโปรตีนจากสัตว์ (Animal proteins) กลับมาใช้ใหม่ในอาหารสัตว์ ภายหลังได้มีการห้ามใช้ โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ในอาหารสัตว์ โดย Regulation (EU) No.51/2013 กล่าวว่า สามารถหาสายพันธุ์ (species) ต้นต้นของโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ได้ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ทั้งนี้ได้มีรายงานของ Fumiere et al. 2012 ที่ใช้วิธีทาง PCR ในการตรวจหาดีเอ็นเอของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์น้ำ โดยได้นำมาทดสอบความใช้ได้ของวิธีและได้มีการตีพิมพ์วิธีดังกล่าวโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงของยุโรปสำหรับการตรวจหาโปรตีนจากสัตว์ (Animal protein) ในอาหารสัตว์

ทั้งนี้หมูเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทหนึ่งที่สามารถติดเชื้อของโรควัวบ้า หรือ Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น วัว แพะ แกะ กระบือ เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดการตายของสัตว์เศรษฐกิจที่ติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่สัตว์เศรษฐกิจจะติดโรควัวบ้าจากการกินเนื้อป่นและกระดูกป่นของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เป็นโรควัวบ้า ในพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ได้กำหนดไว้ว่า “ห้ามพบเนื้อป่นและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง” ดังนั้นหน่วยงานปศุสัตว์ มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินงานตรวจหาเนื้อป่นและกระดูกป่นของหมูอย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันโรคติดต่อจากอาหารสู่สัตว์เศรษฐกิจ และใช้เป็นฐานข้อมูลของการป้องกันเกิดโรคระบาดในสัตว์เศรษฐกิจได้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออกของประเทศไทย

1. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อหมูในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR
2. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

2. ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีในการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนหมู ในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค โดยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างจำนวน 41 ตัวอย่าง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 มีฐานข้อมูลของเนื้อและกระดูกปนของหมูในอาหารสัตว์
- 3.2 มีโครงการวิจัยเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ของประเทศไทยที่เพิ่มมากขึ้น
- 3.3 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทยรวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนอย่างผิดกฎหมาย

4. วิธีดำเนินการ

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre – Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของหมู

นำเนื้อหมูหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและเม็ด จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง ให้มีระดับการปนเปื้อนเนื้อหมู ที่ความเข้มข้น 1%, 0.1% 0.09%, 0.08% และ 0.01% w/w ตามลำดับ

4.1.2 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดที่ผ่านการบดแล้วและตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง จำนวนชนิดละ 5 ตัวอย่าง มาทำการชั่งน้ำหนัก จากนั้นเติมเนื้อหมู (ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง) ลงไปในตัวอย่าง ให้ได้ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ซึ่งระดับความเข้มข้นต่ำสุดนี้ ได้จากผลการทดสอบการหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของหมู ในข้อที่ 4.1.1 ส่วนการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคที่มีการปนเปื้อนเนื้อวัว แกะ แพะ และกระบือที่มีการปนเปื้อนเนื้อที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ทำเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคที่มีการปนเปื้อนเนื้อหมู และในส่วนวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ตรวจสอบมี 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวละเอียด กากถั่วเหลืองและข้าวสาลี

4.2 การสกัดสารพันธุกรรม

สุ่มและชั่งตัวอย่าง ประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ High Pure PCR Template preparation Kit (Roche, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีการสกัดของชุดทดสอบ

4.3 การเตรียมสารละลายปฏิกิริยา Real-time PCR ในการตรวจแยกชนิดเนื้อหมู

4.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Real-time PCR และสภาวะการทำงานของ การตรวจแยกชนิดเนื้อหมู

รหัสพันธุกรรมของการตรวจชนิดเนื้อและกระดูกป็นของหมู จาก *Sus scrofa* Beta actin (ACTB) gene ของหมู (*Sus scrofa*) (GeneBank accession number: DQ452569.1)^a

ตารางที่ 1 โพรเมอร์และโพรบของหมู

Names	Sequence
Porcine-97bp-F	5'-CGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAC -3'
Porcine-97bp-R	5'-GGCCAGACTGGGGACATG-3'
Porcine-97bp-P	5'-(FAM)-CCAGGTCGGGGAGTC-(NFQ-MGB)-3'

หมายเหตุ

a หมายถึง PCR product = 335 – cgtagg tgcacagtag gtctgacgtg actccccgac ctggggctccc cagcacactt agccgtgttc cttgactct ctgcatgtcc ccagtctggc c – 431 – DG452569.1

แหล่งที่มา : ISO/TS 20224-3: 2020

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำยาตรวจดีเอ็นเอกระบือ

รายการ	ปริมาตร (Microliter) /ตัวอย่าง
2X buffer solution (รวม MgCl ₂ , dNTPs และ hot-start DNA polymerase)	12.5
Porcine-97bp-F (10 μmol/L)	1.0
Porcine-97bp-R (10 μmol/L)	1.0
Porcine-97bp-P (10 μmol/L)	0.5
Ultra Pure Distilled water	5.0
รวม	20

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย 45 รอบ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที

5. ผลการทดลอง

5.1 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกป็นของหมู

ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกป็นของหมู จากการเติมเนื้อหมูลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับต่ำสุดเบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่ระดับ 0.09% ดังตารางที่ 3

Negative Control	ไม่พบ
Positive Control	พบ

5.2 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09 % w/w

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09 % w/w ด้วยเครื่อง Real Time PCR พบว่า สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเนื้อหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงทั้ง 10 ตัวอย่างและแบบเม็ดทั้ง 10 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดที่มีการเติมเนื้อวัว แพะ แกะ และกระป๋อง ที่ระดับการปนเปื้อน 0.09 % w/w ราข้าวละเอียด กากถั่วเหลือง ข้าวสาลี และอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนของเนื้อหมูนั้น ให้ผลเป็นไม่พบ ไม่เกิดผลบวกปลอมแต่อย่างใด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09 % w/w

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
Powder 1	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	35.74
Powder 1	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.00
Powder 2	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.25
Powder 2	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.80
Powder 3	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.17
Powder 3	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.52
Powder 4	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.29
Powder 4	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.65
Powder 5	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.80
Powder 5	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	35.66
Powder 6	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.31
Powder 6	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	35.79
Powder 7	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.76
Powder 7	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.28
Powder 8	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	39.08
Powder 8	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.02
Powder 9	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.55
Powder 9	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	36.83
Powder 10	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อหมู 0.09%	+	+	37.10

Tablet 15	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแกะ 0.09%	-	-	
Tablet 15	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแกะ 0.09%	-	-	
Tablet 16	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแกะ 0.09%	-	-	
Tablet 16	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแกะ 0.09%	-	-	
Powder 17	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Powder 17	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Powder 18	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Powder 18	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Tablet 17	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Tablet 17	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
Tablet 18	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
Tablet 18	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.09%	-	-	
RM1	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง ไม่มีเนื้อหมู	-	-	
RM1	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง ไม่มีเนื้อหมู	-	-	
RM2	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด ไม่มีเนื้อหมู	-	-	
RM2	อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด ไม่มีเนื้อหมู	-	-	
RM3	รำข้าวละเอียด	-	-	
RM3	รำข้าวละเอียด	-	-	
RM4	กากถั่วเหลือง	-	-	
RM4	กากถั่วเหลือง	-	-	
RM5	ข้าวสาลี	-	-	
RM5	ข้าวสาลี	-	-	
PC	Positive control	+	+	24.12
PC	Positive control	+	+	24.04
NC	Negative Control	-	-	
NC	Negative Control	-	-	

หมายเหตุ + คือ พบ
- คือ ไม่พบ

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อหมูต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09 % w/w ด้วยเครื่อง Real Time PCR ตาม BQCLP_FQCL_MI_T09_16 พบว่าค่า CP value ที่มากที่สุดเท่ากับ 39.08

ดังนั้น การให้ผลทดสอบเป็น “พบ” สำหรับการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค ค่า CP value ที่ได้ต้องน้อยกว่า 40 ภายใน 45 cycles และให้ผลเป็น “ไม่พบ” เมื่อค่า CP value มากกว่า 40 ภายใน 45 cycles

5.3 การคำนวณหาค่า Relative Trueness (RT), Relative specificity (SP) และ Sensitivity for the alternative method (SE_{alt})

ตารางที่ 5 สรุปผลทวนสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค ที่มีการปนเปื้อนของนม ที่ระดับ LOD 0.09%

ลำดับที่	ชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเนื้อและกระดูกป่นของนม / จำนวนตัวอย่างทดสอบ	
			Reference –Method positive (R+)	Reference –Method Negative (R-)
1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง	19	10/10 (PA)	0/0 (PD)
			0/0 (ND)	9/9 (NA)
2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด	19	10/10 (PA)	0/0 (PD)
			0/0 (ND)	9/9 (NA)
3	วัตถุดิบอาหารสัตว์ (รำข้าวละเอียดกากถั่วเหลือง และข้าวสาลี)	3	0/0 (PA)	0/0 (PD)
			0/0 (ND)	3/3 (NA)
รวม		41	20/20	21/21

จากผลตารางทวนสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค ที่มีการปนเปื้อนของนมที่ระดับ LOD 0.09% นำมาใช้คำนวณค่า Relative Trueness (RT), Relative specificity (SP) และ Sensitivity for the alternative method (SE_{alt}) ให้ผลทดสอบดังนี้

NA (ผลลบตรงกัน) = 21

PA (ผลบวกตรงกัน) = 20

ND (ผลลบปลอม) = 0

PD (ผลบวกปลอม) = 0

N (จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ทดสอบ) = 41

N_- (จำนวนตัวอย่างที่วิธีมาตรฐานให้ผลทดสอบเป็นลบ) = (NA+PD) = 21

N_+ (จำนวนตัวอย่างที่วิธีมาตรฐานให้ผลทดสอบเป็นบวก) = (PA+ND) = 20

Relative Trueness (RT)

$$RT = \frac{PA+NA}{N} \times 100 \%$$

$$= \frac{(20+21)}{41} \times 100 \%$$

41

$$RT = 100.00 \%$$

Relative specificity (SP)

$$SP = \frac{NA}{N} \times 100\%$$

$$SP = \frac{21}{21} \times 100\% \\ = 100.00 \%$$

Sensitivity for the alternative method (SE_{alt})

$$SE_{alt} = \frac{(PA+PD)}{(PA+ND+PD)} \times 100\% \\ = \frac{(20+0)}{(20+0+0)} \times 100\% \\ = 100.00 \%$$

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทวนสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นหมูในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.09% w/w ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 25 mg. โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.09% w/w ในการตรวจพบคือ 40

7. ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นสำหรับอาหารสัตว์ที่ถูกนำเข้ามาจากประเทศแถบยุโรป ควรจะมีการพัฒนาวิธีในเรื่องของการหา primer และ probes ของสัตว์ประจำถิ่นแต่ละประเทศ เพื่อที่จะได้ข้อมูลของการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ได้ และสามารถลดอัตราการนำเข้าของอาหารสัตว์ที่ผิดกฎหมายได้

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยการสนับสนุนของท่านผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (ผอ. พัชรี ทองคำคุณ) ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (นางสุทธิพร พิริยานน) ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

9. เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. พิมพ์ที่ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขา 4

Commission Regulation (EU) No. 51/2013 of 16 January 2013 amending Regulation (EC) No. 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed Text with EEA relevance.

Commission Regulation (EC) No. 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the preventions , control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies.

EURL-AP, 2014, EURL-AP Standard Operating Procedure Detection of ruminant DNA in feed using real-time PCR, 15 p, Available on :

<http://eurl.craw.eu/img/page/sops/EURLAP%20SOP%20Ruminant%20PCR%20V1.0.pdf>

Fumiere, O. Marien, A. Berben, G. 2012. Validation study of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion by for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs,

[http://eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/Ruminant_Validation_Study_draft_ver_15.06\)2012.pdf](http://eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/Ruminant_Validation_Study_draft_ver_15.06)2012.pdf).

ISO 16140-2: 2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO/TS 20224-3: 2020, Molecular biomarker analysis — Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 3: Porcine DNA detection method.

ISO 20813: 2019, Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) – General requirements and definitions.

ISO 21571:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction.

ISO 24276: 2006, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions.

Van Raamsdonk, L.W.D. Von Holst, C. Baeten, V. Berben, G. Boix, A. de Jong, J. 2007. New developments on the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science Technology*, 133: 63-83.