

การพัฒนาวิธีการตรวจ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR

รัฐกานต์ ศรีศิริ แกมกาญจน์ ไชยมงคล เกรียงไกร เกื้อกุล พงษ์เทพ เวียงวะลัย ยุพา จันทร์คำทรัพย์

บทคัดย่อ

การห้ามใช้โปรตีนแปรรูป (Processed animal proteins; PAPs) จากสัตว์เคี้ยวเอื้องมาเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นการป้องกันการระบาดของโรค Bovine spongiform encephalopathy (BSE) เนื่องจากมีความเสี่ยงต่อการแพร่ระบาดจากสัตว์สู่คน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในตัวอย่างอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR ทำการเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปนด้วยวิธี 2-fold trituration จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อสกัด DNA ให้ได้คุณภาพสูง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปและดัดแปลงวิธีด้วยการเติม chloroform แล้วนำไปตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะ และทำการทดสอบความไวของวิธีและความจำเพาะของวิธีกับตัวอย่างอาหารและอาหารสัตว์ ผลการศึกษาพบว่า วิธีการสกัด DNA ทั้ง 2 วิธีให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และระดับการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.01 % w/w นอกจากนี้ วิธีที่พัฒนาขึ้นยังมีความจำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค เพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558

คำสำคัญ : สัตว์เคี้ยวเอื้อง อาหารโค real-time polymerase chain reaction

Method development of ruminants DNA detection in bovine feed by real-time polymerase chain reaction

Rattakan Srisiri Gamgan Chaimongkol Kriangkrai Kuakoon Pongtap Wiangwalai Yupa Jankamsab

Abstract

A ban on processed animal proteins (PAPs) from ruminant species as ingredients in feed, to prevent the outbreak of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). Because of the risk of BSE transmission from animal to human. The objective of this study was to develop a method of ruminant DNA detection in bovine feed by real-time polymerase chain reaction. By preparation of bovine feed mixed with bovine meat and bone meal by 2-fold trituration method and then was studied the optimization of conditions to extract high-quality DNA from samples using commercial test kit and was modified method with additional use of chloroform. After the DNA extraction step, ruminant DNA can be detected using a specific primers and probe and tested the sensitivity and specificity tests with food and feed samples. The result of this study found that both methods used to extract DNA had no statistically significant difference at the level of 0.05, and the limit of detection was 0.01 % w/w. Moreover, the developed method had specific for the ruminant species. Therefore, this method was able to screen and surveillance bovine meat and bone meal adulteration in bovine feed for feed quality control according to Animal feed control ACT, B.E. 2558.

Keywords: Ruminants, Bovine feed, Real-time polymerase chain reaction

บทนำ

ในทางโภชนาศาสตร์สัตว์ (Animal nutrition) โปรตีนแปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Protein; PAPs) ถือเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีโปรตีนสูง เนื่องจากเป็นแหล่งของกรดอะมิโน จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น นม การแปรรูปสัตว์น้ำ รวมทั้งการผลิตอาหารสัตว์ เป็นต้น (Nesic et al., 2019) แต่ภายหลังจากการระบาดของโรค Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่าโรค วัวบ้า (mad cow disease) ได้ถูกพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1986 ในสหราชอาณาจักร มีสาเหตุเกิดจากโปรตีนที่ผิดปกติในเนื้อเยื่อสมองที่เรียกว่า ปริออน (Prion) โดยมีลักษณะพยาธิสภาพของโรคที่ส่งผลต่อระบบประสาท ทำให้สัตว์เสียการควบคุมกล้ามเนื้อ และเสียชีวิตในที่สุด นอกจากนี้โรค BSE ยังถูกจัดอยู่ในกลุ่มโรค Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) ที่สามารถติดต่อได้จากการได้รับเนื้อเยื่อสมองของสัตว์ที่เป็นโรคเข้าสู่ร่างกาย และสามารถพบการระบาดของโรคผ่านทางอาหารสัตว์จากการนำซากที่เหลือจากการชำแหละ (เนื้อและกระดูกป่น) มาทำเป็นอาหารสัตว์

จากหลักฐานการระบาดผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงโดยตรงต่อสัตว์รวมทั้งผู้บริโภค จึงได้มีการออกระเบียบ/กฎหมายต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น Regulation EU 999/2001 และ Regulation EU 1234/2003 ห้ามใช้ PAPs ที่มีส่วนประกอบของสัตว์เคี้ยวเอื้องในฟาร์มสัตว์ที่สามารถส่งต่อโรคผ่านทางห่วงโซ่อาหารมาสู่คน รวมทั้งเนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal) ที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ ยกเว้น ปลาป่นที่ไม่มีส่วนประกอบของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่นเดียวกับประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบ ข้อ 5 (2) ห้ามใช้เนื้อป่น เนื้อป่นสกัดไขมัน เนื้อและกระดูกป่น เป็นส่วนผสมในการผลิตเป็นอาหารสัตว์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการงานกายภาพ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ดำเนินการตรวจวิเคราะห์การปลอมปนเนื้อและกระดูกป่นในอาหารโคด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถตรวจแยกส่วนประกอบของสัตว์ได้เพียงลักษณะทางกายภาพเท่านั้น ไม่สามารถบ่งบอกชนิดของเนื้อและกระดูกป่นสัตว์ที่ปลอมปนได้ และยังคงอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง (Mendoza-Romero et al., 2004) จากข้อจำกัดข้างต้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิค real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย โดยใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้นขณะที่ DNA เป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกๆ รอบ ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ตั้งแต่ต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) ซึ่งปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบของช่วง exponential phase ดังนั้นการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะช่วยให้ผลวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง จึงทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ และด้วยเหตุที่อาหารสัตว์ถือเป็นต้นน้ำของห่วงโซ่อุปทาน (supply chain) เนื่องจากการใช้วัตถุดิบทั้งพืชและสัตว์มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ จึงต้องมีการควบคุม

คุณภาพของวัตถุดิบอาหารสัตว์ให้ได้มาตรฐานตรงตามที่กฎหมายกำหนด เพื่อยกระดับความปลอดภัยให้สินค้าปศุสัตว์เป็นไปตามหลักอาหารปลอดภัย (food safety) และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในตัวอย่างอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยการหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัด DNA และหาพารามิเตอร์แสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบ เช่น ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) เป็นต้น

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีการตรวจ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ใช้ในการตรวจ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR สำหรับนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค เพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ให้เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่อง Real-time PCR ยี่ห้อ Roche รุ่น LightCycler[®] 480 II (Roche, Germany)
- 4.1.2 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบบ 3D Mixer
- 4.1.3 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nanodrop (Eppendorf, Germany)
- 4.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Eppendorf, Germany)
- 4.1.5 เครื่องบดตัวอย่าง (Retsch ZM200, Germany)
- 4.1.6 เครื่อง Heating block (Techne, UK)
- 4.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope (Olympus, Germany)
- 4.1.8 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope (Olympus, Germany)
- 4.1.9 หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorf, Germany)
- 4.1.10 Micropipette ขนาด 1-10, 10-100, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany)

4.2 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

- 4.2.1 Isopropanol, molecular biology grade (Merck, USA)
- 4.2.2 Ethanol, molecular biology grade (Merck, USA)
- 4.2.3 Chloroform, AR grade (Merck, USA)
- 4.2.4 High Pure PCR Template Preparation kit for DNA extraction (Roche, Germany)

4.2.5 LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Germany)

4.2.6 DNaAnimal Screen Ruminant kit (Eurofin, Germany)

4.2.7 Primer and probes specific to ruminants DNA (Biosearch Technologies, England)

4.2.8 HyClone HyPure Molecular Biology Grade Water (Hyclone, USA)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และวางแผนการทดลอง

5.2 จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี น้ำยาทดสอบ และตัวอย่างอาหารโค เพื่อใช้ในการทดสอบ

5.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด DNA

ชั่งตัวอย่างอาหารโคจำนวน 2 หลอดๆละ 25 มิลลิกรัม หลอดที่ 1 สกัด DNA จากตัวอย่างอาหารโค โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation Kit ตามคำแนะนำของบริษัท (Roche, Germany) ส่วนหลอดที่ 2 ดัดแปลงวิธีการสกัด DNA จากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation Kit โดยเพิ่มขั้นตอนที่ 3 คือ เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ตามตารางที่ 1 จากนั้นทำการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้สถิติแบบ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หากผลการเปรียบเทียบวิธีสกัด DNA ให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าวิธีสกัด DNA ตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ เหมาะจะนำมาใช้สำหรับสกัด DNA ในการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงวิธีสกัด DNA ตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ และวิธีที่ดัดแปลงฯ

ขั้นตอนที่	วิธีตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ (High Pure PCR Template Preparation Kit)	วิธีที่ดัดแปลงจากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ (Modified High Pure PCR Template Preparation Kit)
1	ชั่งตัวอย่าง 25 มิลลิกรัม	
2	เติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ proteinase K ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้น vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นที่เครื่อง Heating block ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง	
3 (ขั้นตอนที่ดัดแปลง)	-	เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้ว invert tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g นาน 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant)
4	เติม binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้ว vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นที่เครื่อง Heating block ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	

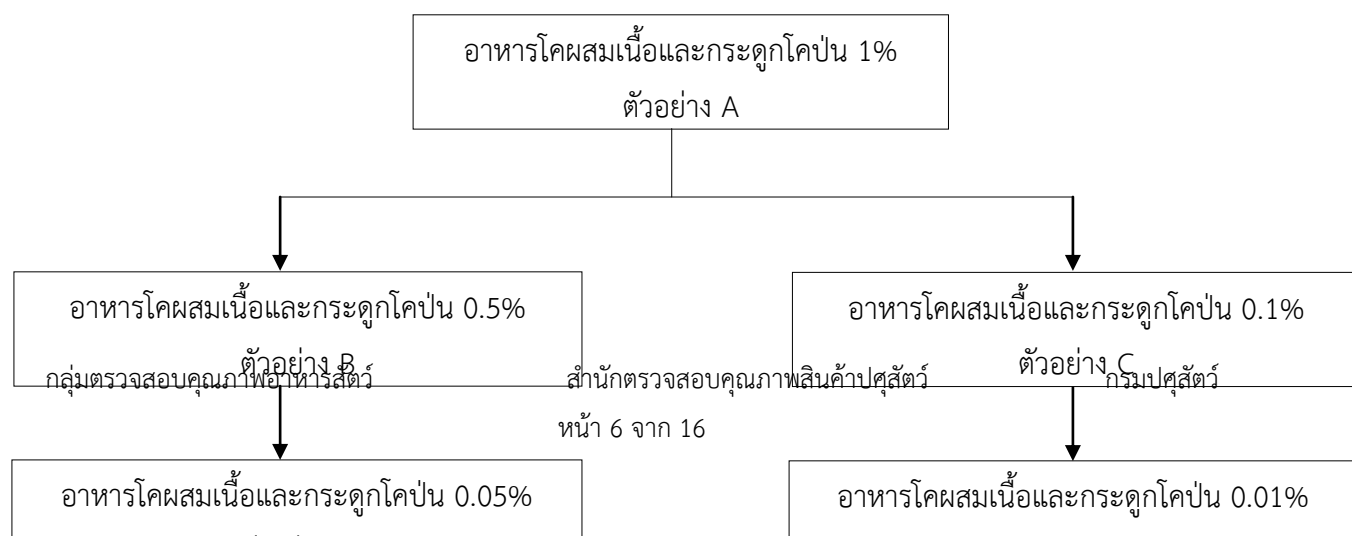
5	เติม isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้ว vortex ให้เข้ากัน
6	ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน filter tube ที่วางบน collection tube (หลอดที่ 1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 1 นาที จากนั้นทิ้ง collection tube และสารที่ไหลผ่าน แล้วเก็บส่วน filter tube ใส่เข้ากับ collection tube (หลอดที่ 2)
7	เติม inhibitor removal ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 1 นาที จากนั้นทิ้ง collection tube และสารที่ไหลผ่าน แล้วเก็บส่วน filter tube ใส่เข้ากับ collection tube (หลอดที่ 3)
8	เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 1 นาที จากนั้นทิ้งสารที่ไหลผ่าน filter tube และทำซ้ำอีกครั้ง
9	นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g นาน 10 วินาที เพื่อปั่นแห้ง
10	ย้าย filter tube ใส่ในหลอด microcentrifuge
11	เติม elution buffer ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 1 นาที
12	วัดปริมาณ DNA ของตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nanodrop ที่ OD ₂₆₀

5.4 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

5.4.1 นำตัวอย่างเนื้อและกระดูกโคบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดตัวอย่าง ก่อนนำไปใช้ผสมกับอาหารโค

5.4.2 ทำการบดตัวอย่างอาหารโคให้เป็นผง โดยใช้เครื่องบดตัวอย่าง จากนั้นนำมาตรวจสอบการปลอมปนเนื้อและกระดูกปนเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ Compound microscope เพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างอาหารโคที่จะนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างไม่มีการปลอมปนเนื้อและกระดูกปน

5.4.3 นำตัวอย่างเนื้อและกระดูกโคปนที่เตรียมได้จากข้อ 5.4.1 มาผสมกับอาหารโคจากข้อ 5.4.2 เพื่อเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปนที่ 6 ระดับ คือ 1% 0.5% 0.1% 0.05% 0.01% และ 0.005% ด้วยวิธี 2-fold trituration (Nakamura et al., 2004) โดยใช้เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบบ 3D Mixer ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน

5.4.4 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 1% (ตัวอย่าง A)

ชั่งตัวอย่างอาหารโค 1 กรัมผสมกับเนื้อและกระดูกโคปน 1 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ เป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 2 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 4 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 8 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 16 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 32 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที และเติมตัวอย่างอาหารโค 36 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้น้ำหนักรวม 100 กรัม จากนั้นทำการผสมตัวอย่างครั้งสุดท้ายโดยเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

5.4.5 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.5% (ตัวอย่าง B)

ชั่งตัวอย่างอาหารโค 25 กรัมผสมกับตัวอย่าง A น้ำหนัก 25 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้น้ำหนักรวม 50 กรัม จากนั้นทำการผสมตัวอย่างครั้งสุดท้ายโดยเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

5.4.6 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.1% (ตัวอย่าง C)

ชั่งตัวอย่างอาหารโค 5 กรัมผสมกับตัวอย่าง A น้ำหนัก 5 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมตัวอย่างอาหารโค 10 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 20 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที และเติมตัวอย่างอาหารโค 10 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้น้ำหนักรวม 50 กรัม จากนั้นทำการผสมตัวอย่างครั้งสุดท้ายโดยเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

5.4.7 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.05% (ตัวอย่าง D)

ชั่งตัวอย่างอาหารโค 25 กรัมผสมกับตัวอย่าง B น้ำหนัก 25 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้น้ำหนักรวม 50 กรัม จากนั้นทำการผสมตัวอย่างครั้งสุดท้ายโดยเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

5.4.8 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.01% (ตัวอย่าง E)

ชั่งตัวอย่างอาหารโค 5 กรัมผสมกับตัวอย่าง C น้ำหนัก 5 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ฯ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมตัวอย่างอาหารโค 10 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมตัวอย่างอาหารโค 20 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที และเติมตัวอย่างอาหารโค 10 กรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้น้ำหนักรวม 50 กรัม จากนั้นทำการผสมตัวอย่างครั้งสุดท้ายโดยเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

5.5 การออกแบบ primers และ probe

Primers และ probe ของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่นำมาใช้พัฒนาวิธีอ้างอิงมาจาก EURL, 2021 และตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้ฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: NCBI เพื่อให้มั่นใจว่า primers และ probe ที่จะนำมาใช้มีความจำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยโพรบติดฉลากตำแหน่ง 5' ด้วยสี FAM และตำแหน่ง 3' ด้วย BHQ1 quencher ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Primers และ probe ที่จำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง

Name	Sequence	Length of amplified product (bp)
Ruminant forward primer	5'-CCAGCATCAGAGTCTTTTCCAAAT-3'	85
Ruminant reverse primer	5'-GAAGGAATGATGATGCTAAAGCTGAAA-3'	
Ruminant probe	5'-CAACTCTTCGCATGAGGTGGCCAAA-3'	

5.6 การเตรียมน้ำยาปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมของน้ำยาปฏิกิริยา real-time PCR

ส่วนผสมของน้ำยา	1 reaction (ไมโครลิตร)
2X Probes Master	12.07
Water, PCR grade	5.00
10 µM Ruminant forward primer	1.10
10 µM Ruminant reverse primer	1.10
5 µM Ruminant probe	0.73
DNA template	5.00
Total PCR mix volume/reaction	25

5.7 สภาวะในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

ตารางที่ 4 สภาวะในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	เวลา (นาที:วินาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Pre-PCR: activation of DNA polymerase and denaturation of template DNA	5:00	95
PCR 50 cycles		
Denaturation	00:15	95
Annealing and elongation	01:00	60
Cooling	00:10	40

5.8 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)

นำตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน A B C D และ E ที่เตรียมจากข้อ 5.4.3 มาทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ยกเว้นตัวอย่าง F จะไม่นำมาทดสอบ เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นต่ำกว่า Limit of detection (LOD) ของชุดทดสอบสำเร็จรูป *DNAAnimal Screen Ruminant Kit* โดยทำการสุมตัวอย่างละ 10 ถูๆ จำนวนถูละ 2 ซ้ำ รวมเป็น 20 ซ้ำ แล้วนำมาสกัด DNA ตามวิธีที่ได้จากข้อ 5.3 จากนั้นทำการตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป *DNAAnimal Screen Ruminant Kit* เพื่อยืนยันว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D Mixer ทำให้ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และเป็นวิธีที่เหมาะสมจะนำมาใช้เตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5.9 ทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ส่งตรวจห้องปฏิบัติการและตัวอย่างอื่นด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

นำตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ขนไก่ปน ปลาปน อาหารสำเร็จรูปสำหรับโค อาหารสำเร็จรูปสำหรับสุกร และตัวอย่างทดสอบความชำนาญรายการ processed animal proteins (EURL-AP) มาสกัด DNA ตัวอย่างละ 2 ซ้ำตามวิธีที่ได้จากข้อ 5.3 แล้วนำมาตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และเปรียบเทียบผลที่ได้กับชุดทดสอบสำเร็จรูป *DNAAnimal Screen Ruminant Kit*

5.10 ทดสอบความไวของวิธี (Sensitivity test)

ตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน A B C D E และ F ที่เตรียมจากข้อ 5.4.3 นำมาสกัด DNA ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตามวิธีที่ได้จากข้อ 5.3 จากนั้นนำไปตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ด้วยวิธี

real-time PCR ซึ่งระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลบวกของ DNA เป้าหมาย (target DNA) ในทุกซ้ำ จะถือว่าเป็นความไวของวิธี

5.11 ทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity test)

ทำการทดสอบความจำเพาะของวิธี โดยใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ จำนวน 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเนื้อวัว จำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่มีส่วนประกอบของสัตว์เคี้ยวเอื้องผสมอยู่ จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวโพดปน ข้าวบาร์เลย์ เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อหมู และเนื้อปลา มาสกัด DNA ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตามวิธีที่ได้จากข้อ 5.3 แล้วนำมาตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ด้วยวิธี real-time PCR และนำผลทดสอบที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูป DNAnimal Screen Ruminant Kit ว่าตรงกันหรือไม่ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อสัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้น

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

6.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด DNA

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด DNA จากตัวอย่างอาหารโค โดยดัดแปลงวิธีสกัด DNA พบว่า การสกัด DNA ตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ (ไม่เติม chloroform) จะได้ความเข้มข้นเฉลี่ยของ DNA เท่ากับ 48.14 ในขณะที่เมื่อเติม chloroform จะได้ความเข้มข้นเฉลี่ยของ DNA เท่ากับ 45.27 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA โดยใช้สถิติแบบ paired t-test พบว่า ทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($t_{cal} < t_{cri}$) ดังตารางที่ 5 และความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี มีค่าตั้งแต่ 30-80 ng/ μ L และได้ค่าความบริสุทธิ์ของ DNA (A_{260}/A_{280}) ตั้งแต่ 2.00 ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Usman และคณะ (2014) ที่ได้กล่าวถึงอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ไว้ว่าหากมีค่าตั้งแต่ 1.8 ขึ้นไป แสดงว่า DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ เช่นเดียวกับ Mihuaiu และคณะ (2009) ได้รายงานอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} มีค่าอยู่ระหว่าง 1-2 บ่งบอกว่า DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้กับงาน PCR ได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 วิธีเป็นวิธีที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการสกัด DNA แต่เนื่องจากวิธีสกัด DNA ตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ สามารถช่วยประหยัดเวลาการทำงานได้มากกว่าวิธีที่ดัดแปลงฯ และปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน เนื่องจากไม่ต้องใช้ chloroform ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางและตับ (US EPA, 2001) ดังนั้น จึงเลือกใช้วิธีสกัด DNA ตามชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปฯ สำหรับการศึกษา

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA

วิธีสกัด DNA	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	ค่าสถิติ
High Pure PCR Template	48.14	2.07	$t_{cal} = 1.04$
Preparation Kit			$t_{cri} = 2.26$
Modified High Pure PCR	45.27	2.09	

หมายเหตุ: เกณฑ์การยอมรับ: $t_{cal} < t_{cri}$ แสดงว่า ทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

6.2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

จากการเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปนที่ 6 ระดับการปนเปื้อน ด้วยวิธี 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D Mixer เพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่า ตัวอย่าง A B C D และ E สามารถตรวจพบ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ทั้ง 20 ซ้ำในทุกตัวอย่าง ดังตารางที่ 6 สอดคล้องกับการศึกษาของสุรตนาและไกรวุฒิ (2564) ที่ทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และผลพลอยได้จากเป็ด ที่ระดับ 0.01% - 1% เตรียมด้วยวิธี 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D Mixer ได้ผลพบ DNA ในทุกตัวอย่าง จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีดังกล่าวมีความเป็นเนื้อเดียวกัน จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เตรียมตัวอย่างของแข็งผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับศึกษาพารามิเตอร์ต่อไป

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

ตัวอย่าง	ระดับการปนเปื้อน	ผลการตรวจหา DNA สัตว์เคี้ยวเอื้อง ตรวจ/พบ (จำนวนซ้ำ)
A	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 1%	20/20
B	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.5%	20/20
C	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.1%	20/20
D	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.05%	20/20
E	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.01%	20/20
F	อาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน 0.005%	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึง not applicable

6.3 ผลการทดสอบหาความไวของวิธี

จากการทดสอบหาความไวของวิธี โดยใช้ตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปนที่ 6 ระดับการปนเปื้อน พบว่า ตัวอย่าง E เป็นระดับการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ทุกซ้ำ โดยมีค่าเฉลี่ย Threshold cycle (C_t) เท่ากับ 30.60 ± 0.08 ดังตารางที่ 7 จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปนที่ระดับ 0.01 % w/w เป็นค่าความไวของวิธีที่พัฒนาขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shehata และคณะ (2019) ที่กล่าวถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลบวกของ DNA เป้าหมาย (target DNA) จะถือว่าเป็น

ความไวของวิธี นอกจากนี้ ความไวของวิธียังแสดงถึงขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) (Bustin et al., 2009)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความไวของวิธี

ตัวอย่าง	ระดับการปนเปื้อน	Threshold cycle (C_t)		
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย $C_t \pm SD$
A	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 1%	22.19	22.59	22.39 $\pm$ 0.28
B	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 0.5%	23.73	23.71	23.72 $\pm$ 0.01
C	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 0.1%	26.88	26.75	26.82 $\pm$ 0.09
D	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 0.05%	27.77	27.63	27.70 $\pm$ 0.10
E	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 0.01%	30.66	30.54	30.60 $\pm$ 0.08
F	อาหารโคผสมเนื้อและ กระดูกโคน 0.005%	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่พบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกโคน

6.4 ผลทดสอบความจำเพาะของวิธี

จากการนำตัวอย่างเนื้อสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ จำนวน 9 ตัวอย่างมาทดสอบความจำเพาะของวิธี พบว่า มีเพียงตัวอย่างเนื้อวัวเท่านั้นที่ตรวจพบ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในขณะที่อีก 8 ตัวอย่างไม่พบ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องปนเปื้อนอยู่ เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวไม่มีส่วนประกอบของสัตว์เคี้ยวเอื้องผสมอยู่ ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหวังไว้ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้น ดังตารางที่ 8 สอดคล้องกับรายงานของ Bustin และคณะ (2009) ที่กล่าวถึงความจำเพาะของวิธี PCR ไว้ว่าเป็นการแสดงถึงความสามารถในการ amplify เฉพาะสายพันธุ์หรือสปีชีส์เป้าหมายเท่านั้น

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี

ชนิดตัวอย่าง	ผลการตรวจหา DNA สัตว์เคี้ยวเอื้อง ด้วยวิธี real-time PCR	
	วิธีที่พัฒนาขึ้น	DNAnimal Screen Ruminant Kit
เนื้อวัว	พบ	พบ
เนื้อไก่	ไม่พบ	ไม่พบ
เนื้อเป็ด	ไม่พบ	ไม่พบ
เนื้อหมู	ไม่พบ	ไม่พบ
เนื้อปลา	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วเขียว	ไม่พบ	ไม่พบ
ถั่วเหลือง	ไม่พบ	ไม่พบ
ข้าวโพดปน	ไม่พบ	ไม่พบ
ข้าวบาร์เลย์	ไม่พบ	ไม่พบ

6.5 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ส่งตรวจห้องปฏิบัติการและตัวอย่างอื่นด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

จากการนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในตัวอย่างอาหารสัตว์และตัวอย่างอื่น จำนวน 10 ตัวอย่าง พบผลบวกจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ รายการ processed animal proteins (EURL-AP) ที่มี DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องปนเปื้อนอยู่ และให้ผลตรงกับรายงานผลทดสอบความชำนาญของ EURL-AP (2022) ในขณะที่อีก 7 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่พบ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และเมื่อนำผลทดสอบที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลทดสอบจากชุดทดสอบสำเร็จรูปฯ พบว่าให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง ตามตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างส่งตรวจในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างอื่นได้จริง

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ประเภทตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ผลการตรวจหา DNA สัตว์เคี้ยวเอื้อง ด้วยวิธี real-time PCR	
		วิธีที่พัฒนาขึ้น	DNAnimal Screen Ruminant Kit
ตัวอย่างส่งตรวจ	- ขนไก่ปน	ไม่พบ	ไม่พบ
ห้องปฏิบัติการ	- ปลาปน	ไม่พบ	ไม่พบ
	- อาหารสำเร็จรูปสำหรับโค	ไม่พบ	ไม่พบ
	- อาหารสำเร็จรูปสำหรับสุกร	ไม่พบ	ไม่พบ
ตัวอย่างทดสอบ	- Milk replacer	พบ	พบ
ความชำนาญ	- Tuna meal	ไม่พบ	ไม่พบ
กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์		สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์	กรมปศุสัตว์

(EURL-AP)	- Salmon meal + 1% pig PAP	ไม่พบ	ไม่พบ
	- Pig feed+1% haemoglobin powder	ไม่พบ	ไม่พบ
	- Mixed blood meal	พบ	พบ
	- Plasma powder + 1% collagen	พบ	พบ

7. สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีการตรวจ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารโค ด้วยเทคนิค real-time PCR เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ primers และ probe ที่จำเพาะกับ DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องตาม EURL, 2021 และเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมเนื้อและกระดูกโคปน ด้วยวิธี 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D Mixer เพื่อช่วยให้ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด DNA โดยการดัดแปลงวิธีสกัดจากชุดทดสอบสำเร็จรูปฯ (เดิม chloroform) ผลทดสอบที่ได้ใกล้เคียงกับวิธีเดิม จึงเลือกใช้วิธีสกัด DNA ตามชุดทดสอบฯ เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน จากนั้นได้ทำการทดสอบความไวของวิธีและความจำเพาะของวิธีกับตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ พบว่า ระดับการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.01 % w/w และวิธีมีความจำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารสัตว์และตัวอย่างอื่น พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจหา DNA ของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้จริง

8. ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้เป็นแนวทางสำหรับต่อยอดงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ เช่น การหาปริมาณสารพันธุกรรมของสัตว์เคี้ยวเอื้องในตัวอย่างอาหารโค ด้วยวิธี digital Polymerase chain reaction (dPCR)

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงาน

ขอขอบคุณนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และนางสาวสุรรัตน บุญใส ที่ให้คำแนะนำการเตรียมตัวอย่างและการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณนายศิริวัฒน์ رایณะสุข นางสาวโสภา ถ้ำแก้ว และบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ งานกายภาพ งานสารตกค้าง งานเคมี และงานจุลชีววิทยาที่เอื้อเพื่ออุปกรณ์และเครื่องมือในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ จนทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภท วัตถุดิบ ข้อ 5 (2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132/ตอนพิเศษ322ง/หน้า 12.
- สุรัตน์ บัญไธ และไกรวุฒิ นวลขาว. 2564. การพัฒนาวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. BQCLP E-Journal, 12(1), 1-25. doi: <http://qcontrol.dld.go.th/images/ejournal/ejournal%201-2564/5-1.pdf>.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele and C.T. Wittwer. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4): 611–622.
- Eurofins GeneScan Technologies GmbH. 2017. *DNA Animal Screen Ruminant*. 1-32.
- European Commission. 2001. Commission Regulation 999/2001 of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control, and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Commun.* L147, 1-40.
- European Commission. 2003. Commission Regulation 1234/2003 of 10 July 2003 Amending Annexes I, IV and XI to Regulation (EC) No.999/2001 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No. 1326/2001 as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. *Off J. Eur. Commun.* L173/6, 1-8.
- Mendoza-Romero, L., EL. Verkaar, PH. Savelkoul, A. Catsburg, HJ. Aarts, JB. Buntjer and JA. Lenstra. 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *Journal of Food Protection*. 67(3): 550-554.
- Mihuaiu, R. M. Mihuaiu, T. Oroian, SD. Dan, CT. Carsai, R. Oroian, A. Lapusan, IC. Chichisan. 2009. DNA extraction methods used in leptins identification from buffalo milk. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*. 66(2): 300-305.
- Nakamura, H., Y. Yanagihara, H. Sekiguchi, F. Komada, H. Kawabata, M. Ohtani, Y. Saitoh, S. Kariya, H. Suzuki, K. Uchino and T. Iga. 2004. Effect of Mixing Method on the Mixing

- Degree during the Preparation of Triturations. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 124: 127-134.
- Nesic, K., N. Pavlivic, M. Pavlovic, A. Tasic, J. Kureljusic, N. Rokvic and V. Radosavljevic. 2019. Testing animal feed for the presence of ruminant DNA using the official real-time PCR method. *IOP Conf. Series: Earth and environmental Science*, 333: 1-5.
- Rohce. 2017. LightCycler 480 Probes Master. 1-17.
- Roche. 2019. Hight Pure PCR Template Preparation Kit. 1-18.
- Shehata, H. R., S. Ragupathy, D. Shanmughanandhan, P. Kesanakurti, T. M. Ehlinger and S. G. Newmaster. 2019. Guidelines for Validation of Qualitative Real-time PCR Methods for Molecular Diagnostic Identification of Probiotics. *Journal of AOAC International*, 102(6): 1774-1778.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2001. Toxicological Review of Chloroform.
- Usman, T. Y. Yu, C. Liu, Z. Fan and Y. Wang. 2014. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genetics and Molecular Research*. 13(2): 3319-3328.
- Veys, P., O. Fumière and A. Marien. 2022. Combined microscopy-PCR EURL-AP Proficiency Test 2021. EURL-Animal Proteins, 1-18. doi: <https://www.eurl.craw.eu/wp-content/uploads/2022/03/EURL-AP-report-2021-final.pdf>