

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนมาในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล และณัฐพล เลี้ยงเพชร

บทคัดย่อ

จากปัญหาเรื่องการระบาดของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ในทั่วโลก จึงต้องมีการหาไพรเมอร์ (primer) และ โพรบ (probe) เพื่อใช้ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้คือ เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ Limit of Detection (LOD) และการปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 0.1% ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของม้า โดยเทคนิค Real-time PCR ใช้วิธีตาม ISO/TS 20224-6: 2020 จากผลการทดลอง ตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของเนื้อม้าในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคทั้งหมด 44 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกปนของม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.1% w/w ตามลำดับ โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0 ในการตรวจพบคือ 39

คำสำคัญ : เนื้อและกระดูกปน, Real-time PCR, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Wantana Jantaramongkon and Nattaphol Liangpetch

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 horse in cow feed by Real Time PCR technique. The Real-Time PCR techniques are follows by ISO/TS 20224-6: 2020. From the results, Horse detection in the total of feed samples were 44 samples, the Limit of Detection (LOD) is 0.1% w/w, which the highest Cp value at 39.

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

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล และ ณัฐพล เลียงเพ็ชร

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

ทั้งนี้มาเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทหนึ่งที่สามารถติดเชื้อของโรควัวบ้า หรือ Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น วัว แพะ แกะ กระบือ เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดการตายของสัตว์เศรษฐกิจที่ติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่สัตว์เศรษฐกิจจะติดโรควัวบ้าจากการกินเนื้อป่นและกระดูกป่นของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เป็นโรควัวบ้า ในพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ได้กำหนดไว้ว่า “ห้ามพบเนื้อป่นและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง” ดังนั้นหน่วยงานปศุสัตว์ มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินงานตรวจหาเนื้อป่นและกระดูกป่นของมั่วอย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันโรคติดต่อจากอาหารสู่สัตว์เศรษฐกิจ และใช้เป็นฐานข้อมูล

ของการป้องกันเกิดโรคระบาดในสัตว์เศรษฐกิจได้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออกของประเทศไทย

1. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อม้าในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR
2. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

2. ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีในการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนม้า ในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค โดยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างจำนวน 60 ตัวอย่าง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 มีฐานข้อมูลของเนื้อและกระดูกปนของม้าในอาหารสัตว์
- 3.2 มีโครงการวิจัยเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ของประเทศไทยที่เพิ่มมากขึ้น
- 3.3 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการนำเข้า-ส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทยรวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนอย่างผิดกฎหมาย

4. วิธีดำเนินการ

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

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

นำเนื้อม้าหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและเม็ด จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง ให้มีระดับการปนเปื้อนเนื้อม้า ที่ความเข้มข้น 1%, 0.1% และ 0.01% w/w ตามลำดับ

4.1.2 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อม้าต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดที่ผ่านการบดแล้วและตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง จำนวนชนิดละ 5 ตัวอย่าง มาทำการชั่งน้ำหนัก จากนั้นเติมเนื้อม้า (ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง) ลงไปในตัวอย่าง ให้ได้ระดับการปนเปื้อนเนื้อม้าต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ซึ่งระดับความ

เข้มข้นต่ำสุดนี้ ได้จากผลการทดสอบการหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของม้า ในข้อที่ 4.1.1 ส่วนการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคที่มีการปนเปื้อนเนื้อวัว แกะ แพะ หมู และกระบือที่มีการปนเปื้อนเนื้อที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ทำเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคที่มีการปนเปื้อนเนื้อม้า และในส่วนวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ตรวจสอบมี 2 ชนิด ได้แก่ 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 ในการตรวจแยกชนิดเนื้อม้า

4.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Real-time PCR และสภาวะการทำงานของการทำงานของตรวจแยกชนิดเนื้อม้า

รหัสพันธุกรรมของการตรวจชนิดเนื้อและกระดูกปนของม้า จาก *Equus caballus* ใน Twilight breed thoroughbred chromosome 28, EquCab3.0 ของม้า (*Equus caballus*) (GeneBank accession number: NC_009171.3)^a

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และโพรบของม้า

Names	Sequence
Horse-125bp-F	5'-ACTCATCAAACGCCGCTCTC -3'
Horse-125bp-R	5'-GCTGTGAAGACCCCGTTGG-3'
Horse-125bp-P	5'-(FAM)-CCAGGGCTCGGTGCTTCCAATCGC-(TAMRA)-3'

หมายเหตุ

a หมายถึง PCR product = 41 821 144 -ACTCATCAAA CGCCGCTCTC GAGATCCGTG CACATCGTTC AATGGAACT TCATTTTAAA AAAGAGAAAA AGGCGATTGG AAGCACCGAG CCCTGGGTAG CGTGTGCCAA CGGGGTCTTC ACAGC- 41 821 268 - NC_009171.3

แหล่งที่มา : ISO/TS 20224-6: 2020

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำยาตรวจดีเอ็นเอม้า

รายการ	ปริมาตร (Microliter) / ตัวอย่าง
2X buffer solution (รวม $MgCl_2$, dNTPs และ hot-start DNA polymerase)	12.5
Horse-125bp-F (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Horse-125bp-R (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Horse-125bp-P (10 $\mu\text{mol/L}$)	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) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของม้า

ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของม้า จากการเติมเนื้อม้าลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับต่ำสุดเบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่ระดับ 1%, 0.1% และ 0.01% w/w ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของม้า ได้ดังนี้

ตัวอย่างทดสอบ	DNA ของม้า
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 1%	พบ

อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 0.1%	พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ดชนิดที่ 3 + เนื้อม้า 0.01%	ไม่พบ
Negative Control	ไม่พบ
Positive Control	พบ

5.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนม้า ในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อม้า ต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ 0.1% w/w

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อม้าต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ 0.1% w/w ด้วยเครื่อง Real Time PCR พบว่า สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเนื้อม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงทั้ง 10 ตัวอย่างและแบบเม็ดทั้ง 10 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดที่มีการเติมเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% w/w, กากถั่วเหลือง ข้าวสาลี และอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนของเนื้อม้านั้น ให้ผลเป็นไม่พบ ไม่เกิดผลบวกปลอมแต่อย่างใด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนน้ำในตัวอย่าง
อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อต่ำสุด (Limit of
Detection, LOD) 0.1 % w/w

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
Powder 1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.28
Powder 1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.51
Powder 2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.76
Powder 2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.93
Powder 3	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.76
Powder 3	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.10
Powder 4	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.49
Powder 4	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	37.38
Powder 5	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	37.81
Powder 5	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.94
Powder 6	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.03
Powder 6	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	38.60
Powder 7	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อ 0.1%	+	+	37.83

	0.1%			
Powder 7	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.28
Powder 8	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.13
Powder 8	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.87

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
Powder 9	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.94
Powder 9	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.14
Powder 10	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.92
Powder 10	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.88
Tablet 1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.43
Tablet 1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.01
Tablet 2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.55
Tablet 2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.52
Tablet 3	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.74
Tablet 3	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.69

Tablet 4	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.75
Tablet 4	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.42
Tablet 5	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.51
Tablet 5	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.35
Tablet 6	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.00
Tablet 6	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.88
Tablet 7	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.63
Tablet 7	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.16
Tablet 8	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.29
Tablet 8	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.21
Tablet 9	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	38.93
Tablet 9	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.50
Tablet 10	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.94
Tablet 10	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อม้า 0.1%	+	+	37.94
Powder 11	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Powder	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อวัว	-	-	

11	0.1%			
Powder 12	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Powder 12	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Tablet 11	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Tablet 11	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Tablet 12	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อวัว 0.1%	-	-	
Tablet 12	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อวัว 0.1%	-	-	

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
Powder 13	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Powder 13	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Powder 14	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Powder 14	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Tablet 13	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Tablet 13	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Tablet 14	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	
Tablet 14	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อแพะ 0.1%	-	-	

[illegible]

Tablet 18	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อหมู 0.1%	-	-	
Powder 19	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Powder 19	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Powder 20	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Powder 20	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Tablet 19	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Tablet 19	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Tablet 20	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
Tablet 20	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด + เนื้อกระบือ 0.1%	-	-	
RM1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผงไม่มีเนื้อม้า	-	-	
RM1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผงไม่มีเนื้อม้า	-	-	
RM2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ดไม่มีเนื้อม้า	-	-	
RM2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ดไม่มีเนื้อม้า	-	-	
RM3	รำข้าวสาลี	-	-	
RM3	รำข้าวสาลี	-	-	

ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
RM4	กากถั่วเหลือง	-	-	
RM4	กากถั่วเหลือง	-	-	
PC	Positive control	+	+	23.66
PC	Positive control	+	+	23.45

NC	Negative Control	-	-	
NC	Negative Control	-	-	

หมายเหตุ + คือ พบ
- คือ ไม่พบ

การพัฒนาวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนมาในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ด ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1% w/w ด้วยเครื่อง Real Time PCR พบว่าค่า CP value ที่มากที่สุดเท่ากับ 38.94

ดังนั้น การให้ผลทดสอบเป็น “พบ” สำหรับการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนมาในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ค่า CP value ที่ได้ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 39 ภายใน 45 cycles และให้ผลเป็น “ไม่พบ” เมื่อค่า CP value มากกว่า 39 ภายใน 45 cycles

5.3 การคำนวณหาค่า True Positive rate (TP) (Sensitivity, SS), False Positive rate (FP), True Negative rate (TN) (Specificity, SP), False Negative rate (FN), และ Efficiency (E)

ตารางที่ 5 สรุปผลทวนสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนในตัวอย่างอาหารสัตว์ ที่มีการปนเปื้อนของน้ำ ที่ระดับ 0.1% w/w

		Case		
		Positive (pc)	Negative (NC)	Result total
Result	Positive (p)	$tp = 20$	$fp = 0$	$p = 20$
	Negative (n)	$fn = 0$	$tn = 24$	$n = 24$
Case total		$pc = 20$	$nc = 24$	

เมื่อ

tn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง
 tp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง
 fn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม
 fp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม
 p คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ($tp + fp$)

n คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลลบ ($tn + fn$)

จากผลตารางทดสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค ที่มีการปนเปื้อนของม้า ที่ระดับ 0.1% w/w นำมาใช้คำนวณค่า True Positive rate (TP) (Sensitivity, SS), False Positive rate (FP), True Negative rate (TN) (Specificity, SP), False Negative rate (FN), และ Efficiency (E) ให้ผลทดสอบดังนี้

True Positive rate (TP) (Sensitivity, SS)	TP	$= \frac{tp}{(tp + fn)} \times 100\%$
	=	$\frac{20}{(20 + 0)} \times 100\%$
	=	100%

False Positive rate (FP)	FP	$= \frac{fp}{(tp + fp)} \times 100\%$
	=	$\frac{0}{(20 + 0)} \times 100\%$
	=	0%

True Negative rate (TN) (Specificity, SP)	TN	$= \frac{tn}{(tn + fp)} \times 100\%$
	=	$\frac{24}{(24 + 0)} \times 100\%$
	=	100%

False Negative rate (FN)	FN	$= \frac{fn}{(tp + fn)} \times 100\%$
	=	$\frac{0}{(20 + 0)} \times 100\%$
		$(20 + 0)$

$$= 0\%$$

$$\begin{aligned} \text{Efficiency (E)} \quad E &= \frac{(tp + tn)}{(p + n)} \times 100\% \\ &= \frac{(20 + 24)}{(20 + 24)} \times 100\% \\ &= 100\% \end{aligned}$$

จากการพัฒนาวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค พบว่า มีค่า Sensitivity, Specificity และ Efficiency เท่ากับ 100% ส่วนค่า False Positive rate และ False Negative rate เท่ากับ 0%

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโค สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นม้าในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผงและแบบเม็ดระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.1%, w/w ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 25 mg. โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1% w/w ในการตรวจพบคือ 39

7. ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นสำหรับอาหารสัตว์ที่ถูกนำเข้ามาจากประเทศแถบยุโรป ควรจะมีการพัฒนาวิธีในเรื่องของการหา primer และ probes ของสัตว์ประจำถิ่นแต่ละประเทศ เพื่อที่จะได้ข้อมูลของการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ได้ และสามารถลดอัตราการนำเข้าของอาหารสัตว์ที่ผิดกฎหมายได้

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยการสนับสนุนของท่านผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (ผอ. เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล) ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พระราชบัญญัติควบคุม
คุณภาพอาหารสัตว์ 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.

Eurachem, 2021. Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical
analysis

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%20
V1.0.pdf](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/TS 20224-6: 2020, Molecular biomarker analysis — Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 6: Horse 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.