

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนเปื้อนในอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ณัฐพล เลี้ยงเพชร พลิศา มหาชัย และวันทนา จันทรมงคล

บทคัดย่อ

จากปัญหาเรื่องการระบาดของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ในทั่วโลก และมีรายงานการพบการระบาดของโรคข้ามสายพันธุ์สัตว์ หนึ่งในนั้นคือสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงยอดนิยมของมนุษย์ จึงมีการหาไพรเมอร์ (primer) และ โพรบ (probe) เพื่อใช้ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของแพะในอาหารสัตว์เลี้ยง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้คือ เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ Limit of Detection (LOD) ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของแพะ โดยเทคนิค Real-time PCR ใช้วิธีตาม ISO/TS 20224-5: 2020 จากผลการทดลอง ตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของเนื้อแพะในอาหารสัตว์เลี้ยงทั้งหมด 36 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกปนของแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.1% w/w ตามลำดับ โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ในการตรวจพบคือ 38

คำสำคัญ : เนื้อและกระดูกปน, Real-time PCR, อาหารสัตว์เลี้ยง

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Meat and Bone meal of Goat Detection in Pet Foods by Real-Time PCR

Nattaphol Liangpetch, Palisa Mahachai and Wantana Jantaramongkon

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 pet food. This research aims to study was analyzed Limit of Detection (LOD) in the detection of meat and bone meal of goat in pet food by Real Time PCR technique. The Real-Time PCR techniques are follows by ISO/TS 20224-5: 2020. From the results, Goat detection in the total of pet food samples were 36 samples, the Limit of Detection (LOD) is 0.1% w/w, which the highest Cp value at 38.

Keywords: Meat and Bone meal (MBM), Real-time PCR, Pet foods

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเครื่อง Real-Time PCR

ณัฐพล เลี้ยงเพชร พลิศา มหาชัย และวันทนา จันทรมงคล

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) ที่รวมทั้งเนื้อและกระดูกปน (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

ทั้งนี้แพะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทหนึ่งที่สามารถติดเชื้อของโรควัวบ้า หรือ Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น แกะ กระบือ ม้า เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถเกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์สู่แมว ซึ่งทำให้เกิดการตายของสัตว์เลี้ยงที่ติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่สัตว์จะติดโรคนี้นี้จากการกินเนื้อปนและกระดูกปนของสัตว์เลี้ยงที่เป็นโรคได้ ซึ่งในหลายๆ ประเทศ ได้กำหนดไว้ว่า “ห้ามพบเนื้อปนและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์เลี้ยง” ในส่วนของประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายการห้ามใส่เนื้อแพะลงในอาหารสัตว์เลี้ยง ดังนั้นหน่วยงานปศุสัตว์ มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินงานในการพัฒนาวิธีตรวจหาเนื้อปนและกระดูกปนของแพะใน

อาหารสัตว์เลี้ยง เพื่อป้องกันการถูกกีดกันทางการค้าจากข้อกำหนดกฎหมายในประเทศคู่ค้าดังกล่าว อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำเข้า-ส่งออกของประเทศไทย

1. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อแพะในอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค Real-Time PCR
2. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

2. ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีในการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง โดยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างจำนวน 46 ตัวอย่าง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 มีฐานข้อมูลของเนื้อและกระดูกปนของแพะในอาหารสัตว์เลี้ยง
- 3.2 มีโครงการวิจัยเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์เลี้ยงของประเทศไทยที่เพิ่มมากขึ้น
- 3.3 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการนำเข้า-ส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทย

4. วิธีดำเนินการ

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre – Limit of Detection, pre-LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของแพะ

นำเนื้อแพะหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ดและชนิดเปียก จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง ให้มีระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะ ที่ความเข้มข้น 10%, 1%, 0.1% และ 0.01% w/w ตามลำดับ

4.1.2 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียกที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4-8 ชั่วโมง ขึ้นกับลักษณะของตัวอย่าง จากนั้นนำอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียกและอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ดมาบดให้ละเอียด จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง มาทำการชั่งน้ำหนัก จากนั้นเติมเนื้อแพะ (ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการบดละเอียดด้วยโกร่ง) ลงไปในตัวอย่าง ให้ได้ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ซึ่งระดับความเข้มข้นต่ำสุดนี้ ได้จากผลการทดสอบการหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, LOD) ที่

สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของแพะ ในข้อที่ 4.1.1 ส่วนการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงที่มีการปนเปื้อนเนื้อวัว แกะ และหมูที่มีการปนเปื้อนเนื้อที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ทำเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงที่มีการปนเปื้อนเนื้อแพะ 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 ในการตรวจแยกชนิดเนื้อแพะ

4.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Real-time PCR และสภาวะการทำงานของการทำงานการตรวจแยกชนิดเนื้อแพะ

ตารางที่ 1 รหัสพันธุกรรมของการตรวจชนิดเนื้อและกระดูกปนของแพะ จาก (*Capra hircus*) เป็น Specific DNA sequence บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ของแพะ (*Capra hircus*) (GenBank accession number: NC_030816.1)a อ้างอิงจาก ISO/TS 20224-5: 2020

Names	Sequence
Goat-87bp-F	5'-GGAAGGAAAGAGAATGGGGATATGG -3'
Goat-87bp-R	5'-TCTCCACACACAGCCAAAACC -3'
Goat-87bp-P	5'-(FAM)-ATCCATCTCTCCCTCCACTCCCTGCCTAA-(TAMRA ^b)-3'

หมายเหตุ

a หมายถึง PCR product = 33 829 251 – GGAAGGAAAG AGAATGGGGA TATGGAGGAA AATTTAGGCA GGGAGTGGAG GGAGATGG ATGTATGGTT TTGGCTGTGT GTGGAGA – 33 829 337 – NC_030816.1

b หมายถึง FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine.) โดย reporter dyes และ / หรือ quencher dyes สามารถใช้ชนิดอื่นได้ถ้าได้ผลที่เหมือนกันหรือดีกว่า

4.3.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Real-time PCR และสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจแยกชนิดเนื้อแพะ

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำยาตรวจดีเอ็นเอแพะ

รายการ	ปริมาตร (Microliter) /ตัวอย่าง
2X buffer solution (รวม $MgCl_2$, dNTPs และ hot-start DNA polymerase)	12.5
Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Probe (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, pre-LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของแพะ

ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์เบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, pre-LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของแพะ จากการเติมเนื้อแพะลงในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ดและตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก ที่ความเข้มข้น 10%, 1%, 0.1%, และ 0.01% w/w ตามลำดับ โดยสามารถตรวจพบค่า cp ได้ที่ความเข้มข้น 0.1% w/w จึงทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1% w/w ดังนั้นระดับต่ำสุดเบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, pre-LOD) ที่สามารถวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนของแพะอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% w/w ดังตารางที่ 3

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

ตัวอย่างทดสอบ	DNA ของแพะ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 10%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 10%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 10%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 10%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.1%	พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.01%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.001%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเม็ดชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.001%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 1 + เนื้อแพะ 0.001%	ไม่พบ
อาหารสัตว์เลี้ยงแบบเปียกชนิดที่ 2 + เนื้อแพะ 0.001%	ไม่พบ
Negative Control	ไม่พบ
Positive Control	พบ

5.2 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 % w/w

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 % w/w ด้วยเครื่อง Real Time PCR นั้น พบว่า สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเนื้อแพะในตัวอย่าง

อาหารสัตว์เลี้ยงทั้ง 36 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงที่มีการเติมเนื้อวัว แกะ และหมูที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 % w/w และอาหารสัตว์เลี้ยงที่ปราศจากการปนเปื้อนของเนื้อแพะนั้น ให้ผลเป็นไม่พบ ไม่เกิดผลบวกปลอมแต่อย่างใด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 % w/w

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
1	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสไก่และตับ)	+	+	35.64
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสไก่และตับ)	+	+	35.52
2	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสทูน่า)	+	+	35.96
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสทูน่า)	+	+	34.77
3	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสแซลม่อน)	+	+	35.75
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสแซลม่อน)	+	+	33.84
4	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสไก่และตับ)	+	+	33.59
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสไก่และตับ)	+	+	34.85
5	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสทูน่า)	+	+	36.05
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแม่ + เนื้อแพะ 0.1% (ขนมแมวเลีย รสทูน่า)	+	+	36.06

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนปะใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อปะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
6	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสแซลม่อน)	+	+	36.03
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสแซลม่อน)	+	+	34.26
7	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสปลาทู)	+	+	34.47
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสปลาทู)	+	+	35.90
8	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสไกรมควันและไก่วง)	+	+	35.92
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสไกรมควันและไก่วง)	+	+	35.66
9	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสแซลม่อน)	+	+	35.63
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสแซลม่อน)	+	+	35.95
10	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสปลาทู)	+	+	36.45
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสปลาทู)	+	+	36.68
11	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมตับไก่)	+	+	35.00
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อปะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมตับไก่)	+	+	35.17

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนปะใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
12	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมกุ้งในน้ำเกรวี่)	+	+	36.36
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมกุ้งในน้ำเกรวี่)	+	+	35.67
13	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสไก่ ผสมปลาแมคเคอเรลในน้ำเกรวี่)	+	+	36.00
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสไก่ ผสมปลาแมคเคอเรลในน้ำเกรวี่)	+	+	35.62
14	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมตับไก่)	+	+	36.14
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมตับไก่)	+	+	34.19
15	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมกุ้งในน้ำเกรวี่)	+	+	34.45
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบซอง รสทูน่า ผสมกุ้งในน้ำเกรวี่)	+	+	34.32
16	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่ในน้ำเกรวี่)	+	+	37.40
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่ในน้ำเกรวี่)	+	+	35.57
17	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสทูน่า ผสมปลาเนื้อขาวในน้ำเกรวี่)	+	+	35.72
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสทูน่า ผสมปลาเนื้อขาวในน้ำเกรวี่)	+	+	36.17
18	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสซาบะในเกรวี่)	+	+	34.79
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสซาบะในเกรวี่)	+	+	35.09
19	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่ในน้ำเกรวี่)	+	+	36.06

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
19	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่ในน้ำเกรวี่)	+	+	36.08
20	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสทูน่า ผสมปลาเนื้อขาวในน้ำเกรวี่)	+	+	35.36
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสทูน่า ผสมปลาเนื้อขาวในน้ำเกรวี่)	+	+	36.45
21	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสตับและผัก)	+	+	34.71
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสตับและผัก)	+	+	35.28
22	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่)	+	+	35.62
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่)	+	+	37.41
23	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่และผัก)	+	+	35.82
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่และผัก)	+	+	36.70
24	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสตับและผัก)	+	+	35.80
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสตับและผัก)	+	+	35.83
25	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่)	+	+	34.38
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (แบบกระป๋อง รสไก่)	+	+	34.76
26	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสชีฟู้ด)	+	+	35.41
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสชีฟู้ด)	+	+	35.98

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
27	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทะเล)	+	+	35.24
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทะเล)	+	+	35.87
28	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทูน่า)	+	+	35.41
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทูน่า)	+	+	35.20
29	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสชีฟู้ด)	+	+	35.73
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสชีฟู้ด)	+	+	35.23
30	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทะเล)	+	+	37.12
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแพะ 0.1% (รสปลาทะเล)	+	+	35.62
31	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสไก่และข้าว)	+	+	34.57
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสไก่และข้าว)	+	+	35.99
32	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสตับ)	+	+	35.87
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสตับ)	+	+	38.51
33	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสแซลม่อน)	+	+	34.64
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสแซลม่อน)	+	+	35.65
34	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสไก่และข้าว)	+	+	33.96

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนปะใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อปะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
35	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสไก่และข้าว)	+	+	34.24
36	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสตับ)	+	+	36.72
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อแพะ 0.1% (รสตับ)	+	+	36.36
37	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อวัว 0.1% (รสหมู่น้ำในเยลลี่)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อวัว 0.1% (รสหมู่น้ำในเยลลี่)	-	-	-
38	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อวัว 0.1% (รสรวมมิตรปลาทะเล)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อวัว 0.1% (รสรวมมิตรปลาทะเล)	-	-	-
39	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแกะ 0.1% (รสหมู่น้ำในเยลลี่)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อแกะ 0.1% (รสหมู่น้ำในเยลลี่)	-	-	-
40	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแกะ 0.1% (รสรวมมิตรปลาทะเล)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว + เนื้อแกะ 0.1% (รสรวมมิตรปลาทะเล)	-	-	-
41	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อหมู 0.1% (รสชะบะย่าง)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว + เนื้อหมู 0.1% (รสชะบะย่าง)	-	-	-
42	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อหมู 0.1% (รสแฮมอ่อน)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข + เนื้อหมู 0.1% (รสแฮมอ่อน)	-	-	-

ตารางที่ 4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนเปื้อนใน
ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อแพะต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1 %
w/w (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ผลทดสอบ ที่คาดหวัง	ผลทดสอบ	ค่า CP
43	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว (รสไก่นิลลี่)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับแมว (รสไก่นิลลี่)	-	-	-
44	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข (รสไก่และกระดูก)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก สำหรับสุนัข (รสไก่และกระดูก)	-	-	-
45	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว (รสหมูและข้าว)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับแมว (รสหมูและข้าว)	-	-	-
46	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข (รสไก่รมควัน)	-	-	-
	อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด สำหรับสุนัข (รสไก่รมควัน)	-	-	-
47	Positive control	+	+	23.48
	Positive control	+	+	23.02
48	Negative control	-	-	-
	Negative control	-	-	-

หมายเหตุ + คือ พบ
- คือ ไม่พบ

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 สรุปผลทวนสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่มีการปนเปื้อนของแพะ ที่ระดับ LOD 0.1% w/w

		Case		
		Positive (pc)	Negative (NC)	Result total
Result	Positive (p)	$tp = 36$	$fp = 0$	$p = 36$
	Negative (n)	$fn = 0$	$tn = 10$	$n = 10$
Case total		$pc = 36$	$nc = 10$	

เมื่อ

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

จากผลตารางทวนสอบวิธีทดสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ที่มีการปนเปื้อนของแพะ ที่ระดับ LOD 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	=	$\frac{tp}{(tp + fn)} \times 100\%$
		=	$\frac{36}{(36 + 0)} \times 100\%$
		=	100%
False Positive rate (FP)	FP	=	$\frac{fp}{(tp + fp)} \times 100\%$
		=	$\frac{0}{(36 + 0)} \times 100\%$
		=	0%

True Negative rate (TN) (Specificity, SP)	TN	=	$\frac{tn}{(tn + fp)} \times 100\%$
		=	$\frac{10}{(10 + 0)} \times 100\%$
		=	100%
False Negative rate (FN)	FN	=	$\frac{fn}{(tp + fn)} \times 100\%$
		=	$\frac{0}{(36 + 0)} \times 100\%$
		=	0%
Efficiency (E)	E	=	$\frac{(tp + tn)}{(p + n)} \times 100\%$
		=	$\frac{(36 + 10)}{(36 + 10)} \times 100\%$
		=	100%

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทวนสอบการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง สรุปผลได้ว่าการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนแพะในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงมีระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ตรวจวัดได้คือ 0.1% w/w โดยมีค่า CP value ที่ระดับต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) 0.1% w/w ในการตรวจพบคือน้อยกว่า 38.00 ภายใน 45 cycles และ น้อยกว่า 40.00 ภายใน 45 cycles ตามลำดับ

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

-

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 20224-5: 2020, Molecular biomarker analysis — Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 1: Goat 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.