

เอกสารวิชาการ

เรื่องที่ 2

การพัฒนาวีธีตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ ด้วย
เทคนิค Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction

โดย

นางสาวสุรตนา บุญใส

นายไกรวุฒิ นวลขาว

เลขทะเบียนวิชาการ 64(2)-0304-117

สถานที่ดำเนินการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564

การเผยแพร่ เว็บไซต์สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

<http://qcontrol.dld.go.th>

การพัฒนาวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค multiplex real-time polymerase chain reaction

สุธนา บุญใส ไกรวุฒิ นวลขาว

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค multiplex real-time polymerase chain reaction ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้วิเคราะห์การปลอมปนของสัตว์ปีกปนในปลาปน ซึ่งปลาปนเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ราคาสูง วิเคราะห์ชนิดสัตว์ปีกปนในอาหารสัตว์สำเร็จรูปซึ่งชนิดสัตว์ปีกปนเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำและมีข้อจำกัดในการใช้ อีกทั้งใช้สนับสนุนการศึกษาความแตกต่างระหว่างกล้ามเนื้อและกระดูกของสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มักพบในอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคและตรวจชนิดเนื้อไก่ในอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของอาการแพ้ในสุนัขและแมว โดยในขั้นการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปตามด้วยการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยคอลโรฟอร์ม ออกแบบไพรเมอร์กับโพรบจำเพาะต่อยีน *Cytochrome b* ของไก่และไพรเมอร์กับโพรบจำเพาะต่อยีน *Displacement loop* ของเป็ดในไมโทคอนเดรียประกอบกับการปรับความเข้มข้นน้ำยาและสถานะของปฏิกิริยา multiplex real-time PCR ทำให้วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้มีความจำเพาะ สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดได้อย่างถูกต้อง มีความไว โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.005% (w/w) ส่วนระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากเป็ดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.002% (w/w) สามารถทดสอบได้รวดเร็วขึ้นและประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป โดยสามารถนำมาใช้เป็นวิธีตรวจสอบชนิดสัตว์ปีกปนในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ สนับสนุนการศึกษาลักษณะกล้ามเนื้อและกระดูกของสัตว์ปีกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์จำนวน 150 ตัวอย่าง พบสารพันธุกรรมของไก่ 5.33% แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด อีกทั้งให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องเมื่อทดสอบกับตัวอย่างทดสอบความชำนาญรายการอาหารสัตว์ เนื้อสัตว์ และตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดในเนื้อสัตว์และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงได้ด้วย

คำสำคัญ: อาหารสัตว์ สารพันธุกรรมของสัตว์ปีก multiplex real-time polymerase chain reaction

เลขทะเบียนวิชาการ: 64(2)-0304-117

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี

Method development for simultaneous detection of poultry genetic material in feeding stuffs using multiplex real-time polymerase chain reaction

Surattana Boonsai Kraiwut Nualkaw

Abstract

Our simultaneous detection of poultry genetic material in animal feeds and feed materials by multiplex real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) assay was developed in order to detect adulterated feather meal in costly fishmeal and low nutritional feather meal in finished feeds, which has been used with limitation. In addition, the method will be used in discrimination between muscle and bone of poultry species and mammal species, which is often found in cattle feed. Furthermore, it will be used to detect chicken DNA, one of allergens in dog and cat, in pet foods. The DNA from samples were isolated using the DNA extraction kit with additional use of chloroform. Chicken and duck-specific primers and probes were designed, based on the mitochondrial *Cytochrome b* gene and *Displacement loop* region respectively. The method could detect chicken and duck DNA accurately with optimization of reagents concentration and multiplex real-time PCR condition. The assay was highly specific for the target species. The sensitivity of chicken and duck by-products in animal feed are 0.005% (w/w) and 0.002% (w/w), respectively. The use of this new method can save time and money compared to using of commercial test kits. It can be used for feather meal detection in finished feed and feed material, implementing in characteristic study of poultry muscle and bone effectively. Additionally, the method was applied to analyze 150 samples of feeding stuffs. The result showed 5.33% chicken DNA without any duck DNA. Finally, the method showed excellent performance in detection of chicken and duck DNA in complete feeds and meat prepared by proficiency test providers and the commercial pet foods. This indicates that the method may be used for chicken and duck detection in meat and petfood products successfully.

Keywords: feeding stuffs, poultry genetic material, multiplex real-time polymerase chain reaction

Registration No.: 64(2)-0304-117

Feed Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo 4, Tiwanon Road, Bangkadi, Mueng, Pathumthani

บทนำ

การปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปนเป็นการกระทำซึ่งเอาเปรียบผู้บริโภค โดยได้นำขนสัตว์ปีกปน ซึ่งเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ราคาถูกกว่าและมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกันมาปลอมลงในปลาปน เพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ได้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของปลาปน พบการปลอมปนของขนสัตว์ปีกปนในปลาปน เช่นเดียวกับประเทศ เนเธอร์แลนด์ที่ได้ตรวจพบการปลอมปนในลักษณะเดียวกัน (The Netherlands food and consumer product safety authority, 2013) สาเหตุของการปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปน คือ ปลาปนมีราคาสูง ในปี พ.ศ. 2561-2563 ราคา ณ ส่งถึงโรงงาน ปลาปนนำเข้าเฉลี่ยกิโลกรัมละ 59 บาท ส่วนปลาปนผลิตใช้ภายในประเทศเฉลี่ยกิโลกรัมละ 36 บาท (สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2564) ประเทศไทยมีการนำเข้าปลาปน ในปี พ.ศ. 2561-2563 เฉลี่ยปีละ 5.5 หมื่นตัน มีการส่งออกเฉลี่ยปีละ 1 แสน 2 หมื่นตัน (กรมการค้าภายใน, 2564) แต่สำหรับขนสัตว์ปีกปนนั้น มีราคาต่ำกว่า มีโปรตีนสูงแต่ย่อยยากเนื่องจากมีกำมะถันสูงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยและมีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) หลายชนิดในระดับต่ำ เช่น เมทไทโอนีน ไลซีน ฮีสทีดีน และทริปโตเฟน ดังนั้นหากมีการปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปนจะส่งผลให้คุณภาพโปรตีนในอาหารสัตว์ด้อยลง (วราพันธุ์, 2553) อีกทั้งการปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปนนั้น เป็นการกระทำที่ขัดต่อประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มาตรา 56 ห้ามผู้ใดผลิตเพื่อขาย นำเข้าเพื่อขาย หรือ ขายอาหารสัตว์ดังต่อไปนี้ (1) อาหารสัตว์ปลอมปน มาตรา 57 อาหารสัตว์ปลอมปน ได้แก่ อาหารสัตว์ตามมาตรา 6 (1) ที่ใช้วัตถุดิบเป็นส่วนผสมไม่ตรงกับที่ขึ้นทะเบียนไว้ ยกเว้นวัตถุดิบซึ่งอาจมีได้โดยธรรมชาติตามที่รัฐมนตรีประกาศกำหนด หรือ (2) อาหารสัตว์ตามมาตรา 6 (2) ที่เพิ่ม สับเปลี่ยน ใช้วัตถุดิบปนหรือลดปริมาณวัตถุดิบที่มีคุณค่า (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558ก)

นอกจากนี้แล้วกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดข้อจำกัดในการใช้และข้อห้ามใช้ขนสัตว์ปีกปนเป็นสูตรในการผลิตอาหารสัตว์ โดยอนุญาตให้ใช้ขนสัตว์ปีกปนเป็นสูตรในการผลิตอาหารสำหรับไก่ เป็ด สุกร และโคได้ไม่เกินร้อยละ 1-5 ของน้ำหนักอาหารสัตว์ ขึ้นกับชนิดและอายุของสัตว์ แต่ห้ามใช้เป็นสูตรอาหารสำหรับสุกรพันธุ์น้ำหนักเกิน 90 กิโลกรัมและสุกรระยะอ้วนท้องและระยะให้นม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558ข) จึงจำเป็นต้องมีการตรวจจำแนกชนิดสัตว์ในวัตถุดิบอาหารสัตว์และอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ในทำนองเดียวกันสหภาพยุโรปได้มีการควบคุมมิให้ใช้ส่วนผสมของสัตว์เป็นอาหารสำหรับสัตว์ชนิดเดียวกัน (species-to-species ban) เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการกินพวกเดียวกันเอง (cannibalism)(European Commission, 2009) จึงมีความจำเป็นในการตรวจวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ถูกนำมาใช้แปรรูปเป็นโปรตีน (processed animal proteins; PAPs) ก่อนใช้ผสมเป็นอาหารสำหรับสัตว์แต่ละชนิด

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์การปลอมปนดังกล่าว คือ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยผู้ทดสอบที่มีความชำนาญสูง จึงมีแนวคิดในการพัฒนาการตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เพื่อเป็นการยืนยันในการวิเคราะห์การปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปนและวิเคราะห์ขนสัตว์ปีกปนในอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์

อีกประเด็นสำคัญที่นำมาสู่การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว คือ การจำแนกชนิดของกระดูกและกล้ามเนื้อของ PAPs ที่พบในอาหารสำเร็จรูปสำหรับโค โดยเนื้อและกระดูกป่นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นวัตถุดิบห้ามใช้ผสมในอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง แต่เนื้อสัตว์ปีกป่น ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก และขนสัตว์ปีกป่นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ปีก ซึ่งไม่ใช่วัตถุดิบห้ามใช้ผสมในอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558ข) แต่ลักษณะทางกายภาพของวัตถุดิบอาหารสัตว์ทั้งสองกลุ่มนั้นมีความใกล้เคียงกันจึงทำให้วิธีการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างกระดูกกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและของสัตว์ปีกได้ ดังนั้นการตรวจสอบสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกด้วยเทคนิค real-time PCR จึงสามารถช่วยสนับสนุนการศึกษากระดูกและกล้ามเนื้อของสัตว์แต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้

รวมไปถึงการวิเคราะห์ส่วนประกอบของอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 มีสถิติส่งออกอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงมูลค่าสูงถึง 3.5 หมื่นล้านบาท (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2561) โดย Mueller และคณะ (2016) รายงานว่าเนื้อไก่ซึ่งมักผสมในอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงเป็นหนึ่งในสาเหตุของอาการแพ้ (cutaneous adverse food reaction, CAFRs) ที่พบได้ทั้งในสุนัขและแมว ซึ่งการสุ่มตรวจสอบส่วนประกอบของอาหารสัตว์เลี้ยงตามฉลากระบุ สามารถช่วยสร้างความมั่นใจให้แก่เจ้าของสัตว์เลี้ยงในการเลือกซื้ออาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงที่ปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงของตนในกรณีที่สัตว์มีอาการแพดังกล่าวได้

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค real-time PCR แบบ probe-based assay ซึ่งสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมเป้าหมาย (target DNA) ได้อย่างเจาะจง โดยมีการเพิ่มและตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้ probe ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น (oligonucleotide) โดยออกแบบให้สามารถเกิดไฮบริดเซชัน (hybridization) กับ target DNA ได้ใช้งานร่วมกับไพรเมอร์ (primers) 1 คู่ ประกอบด้วย forward primer และ reverse primer โดยตำแหน่งของ probe นั้นจะอยู่ระหว่าง forward primer และ reverse primer (Brooker, 2017)

อย่างไรก็ตามเมื่อต้องการตรวจหาสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดนั้น ทำให้ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง เนื่องจากต้องวิเคราะห์หลายรอบ ดังนั้นแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรม 2 เป้าหมายในคราวเดียวกัน โดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีและเวลาในการวิเคราะห์ โดยเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา 1 reaction ประกอบด้วยชุด primers และ probe 1 ชุดที่จำเพาะต่อไก่และอีก 1 ชุดที่จำเพาะต่อเป็ด โดย probe แต่ละชุดจะมีการติด reporter dye ที่มีสีแตกต่างกัน นำมาใช้รวมกันในปฏิกิริยา PCR เดียวกัน ทำให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในคราวเดียวกันได้ (Tsuiji *et al.*, 2018)

ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA) นิยมใช้เป็น biomarker ในการตรวจจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีข้อดี คือ มีจำนวนสำเนาหลายชุดต่อหนึ่งเซลล์ (abundant copy number)

เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA; nDNA) ที่มีสำเนาเพียงหนึ่งชุดต่อหนึ่งเซลล์ ส่งผลให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reaction) มีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณของ mtDNA มากกว่า nDNA จึงเหมาะสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการผลิตด้วยความร้อนสูงหรือความดัน เช่น ขนสัตว์ปีกปน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560) เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างมักจะแตกหักหรือเสื่อมสลาย (DNA degradation) ทำให้เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ยาก (Galimberti *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2017) ปัจจุบันมีหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ mtDNA เป็น biomarker ในการบ่งชี้ชนิดสิ่งมีชีวิต เช่น โค แกะ สุนัข จากตัวอย่างเนื้อที่ผ่านกระบวนการทำให้สุกภายใต้ความดันหรือการทอดได้ (Arslan *et al.*, 2006; Arslan *et al.*, 2009; Mane *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีสภาพใกล้เคียงกับ PAPs ที่ผ่านกระบวนการผลิตด้วยอุณหภูมิสูง

ยีน *Cytochrome b* (*Cytb*) และ *Displacement loop* (*D-loop*) หรือ mitochondrial control region เป็น mtDNA ที่ได้รับความนิยมใช้เป็น biomarker สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของสิ่งมีชีวิต (species identification) โดยยีน *Cytb* เป็นยีนทำหน้าที่เกี่ยวกับ oxidative phosphorylation ที่เกิดวิวัฒนาการน้อยหรือเรียกว่า บริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีลำดับเบสบริเวณนี้แตกต่างกันน้อยมาก (few intra-species polymorphisms) แต่หากเป็นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้ที่แตกต่างกัน (sufficient inter-species polymorphism) ช่วยในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ (Linacre and Lee, 2016) ส่วนบริเวณ *D-loop* หรือ control region นั้น เป็นส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอระหว่างสิ่งมีชีวิตสูงที่สุด (hyper variation region) (Natonek-Wiśniewska and Krzyścin, 2019; Yang *et al.*, 2018) ช่วยให้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ สำหรับการพัฒนานิ่วตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในครั้งนี้ได้เลือกใช้ mtDNA บริเวณ *Cytb* และ *D-loop* เพื่อทดสอบเป็น biomarker 1 ชุด ที่มีความจำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของไก่และอีก 1 ชุดที่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของเป็ด

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ผู้รับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบอาหารสัตว์ สิ่งปลอมปนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และวัตถุดิบต้องห้ามหรือที่ไม่ได้ขอขึ้นทะเบียนในอาหารสัตว์ เห็นถึงประโยชน์ของการพัฒนาการตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีก โดยมุ่งเน้นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไก่ (*Gallus gallus*) และเป็ด (*Anas platyrhynchos*) เนื่องจากในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่ที่มีการผสม PAPs ที่ได้จากไก่ โดยเฉพาะไก่เนื้อ รองลงมาเป็ด ไก่วง เป็ด ห่าน (Pegels *et al.*, 2012) โดยตรวจหาสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดในคราวเดียวกันด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจยืนยันการปลอมปนขนสัตว์ปีกปนในปลาปนเชิงคุณภาพ การตรวจวิเคราะห์ขนสัตว์ปีกปนในอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ การระบุชนิดสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิต PAPs ในตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ ซึ่งสามารถใช้ต่อยอดในการวิเคราะห์ชนิดของสิ่งปลอมปนดังกล่าวเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และใช้ในการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบในอาหารสัตว์เลี้ยงที่อาจก่อให้เกิดอาการแพ้แก่สัตว์เลี้ยงในอนาคตได้ จึงได้พัฒนาไพรเมอร์ (primers) และโพรบ (probe) 1 ชุดที่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของไก่และอีก 1 ชุดที่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของเป็ดบริเวณไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA)

พัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกและขนสัตว์ปีกปน ซึ่งเป็นตัวแทนวัตถุดิบอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่อยู่ในกลุ่ม PAPs ที่ได้จากสัตว์ปีก สามารถนำวิธีที่พัฒนาได้แล้วไปใช้ทดสอบหาสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดในกิจกรรมต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากขึ้น อีกทั้งช่วยลดค่าใช้จ่ายจากการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ และช่วยเสริมสร้างความเป็นธรรมต่อผู้เลี้ยงสัตว์ รวมถึงสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยของสินค้าปศุสัตว์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ครอบคลุมตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์มากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

- 1.1 Isopropanol, molecular biology grade (Merck, USA)
- 1.2 Ethanol, molecular biology grade (Merck, USA)
- 1.3 Chloroform, AR grade (Merck, USA)
- 1.4 High Pure PCR Template Preparation kit for DNA extraction (Roche, Germany)
- 1.5 LightCycler480® Probes Master (Roche, Germany)
- 1.6 Probe and primers specific to chicken's DNA (Biolegio, The Netherlands)
- 1.7 Probe and primers specific to duck's DNA (Biolegio, The Netherlands)
- 1.8 Foodproof® SL Chicken Species Detection Kit (Biotecon, Germany)
- 1.9 Foodproof® SL Duck Species Detection Kit (Biotecon, Germany)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D mixer
- 2.2 Heat block (Techne, UK)
- 2.3 Water bath (Mettler, Germany)
- 2.4 Microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.5 DNA quantifier (Eppendorf, Germany)
- 2.6 LightCycler®480 real-time PCR machine (Roche, Germany)

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

3.1 การเตรียมตัวอย่างของการพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมและหาสถานะที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR

ใช้ตัวอย่างเนื้อไก่บด เนื้อเป็ดบด บรรจุในผลิตภัณฑ์ปิดสนิท ตัวอย่างผลพลอยได้จากสัตว์ปีก และขนสัตว์ปีกปน ที่ได้จากโรงงานผู้ผลิตซึ่งผ่านการทดสอบหาสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปในข้อ 1.8 และ 1.9 แล้วว่าพบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดจริง และตรวจสอบภายใต้กล้อง

จุลทรรศน์ไม่พบสิ่งปลอมปนอื่น มาใช้ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR

3.2 การเตรียมตัวอย่างของการทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่น นอกเหนือจาก ไก่และเป็ด ซึ่งบรรจุในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ ได้แก่ นกกระทา ปลาทุ วัว หมู กบ และจระเข้ ใช้ตัวอย่างพืชที่มักใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสำเร็จรูปสำหรับโค ที่บรรจุในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และข้าว ในการทดสอบความจำเพาะเชิงปฏิบัติ (practical test for specificity)

3.3 การเตรียมตัวอย่างของการทดสอบความไว (sensitivity)

ใช้ตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคที่ส่งมาวิเคราะห์ที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ผ่านการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วว่าไม่พบเนื้อและกระดูกปน ไม่พบผลพลอยได้จากสัตว์ปีกหรือขนสัตว์ปีกปน และตรวจวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนของไก่และเป็ดด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปแล้ว ให้ผลไม่พบสารปนเปื้อนของไก่และเป็ด โดยได้ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับโคเป็นตัวแทนอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคมีส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารสัตว์หลากหลายชนิดขึ้นกับสูตร เช่น ข้าวโพดปนรำสกัดน้ำมัน กากถั่วเหลือง รำสาลี กากปาล์ม กากมันสำปะหลัง ข้าวบาร์เลย์ กากเรปซีด กากทานตะวัน กากถั่วเขียว ปลาปน ขนสัตว์ปีกปน กระณินปน เป็นต้น

3.4 ตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่นำมาทดสอบด้วยวิธี multiplex real-time PCR

ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่ เป็ด สุกร โค และปลาปนที่ส่งมาวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ที่สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ชนิดละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 150 ตัวอย่าง

3.5 ตัวอย่างอื่นที่นำมาทดสอบด้วยวิธี multiplex real-time PCR

3.5.1 ตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับทดสอบความชำนาญรายการ processed animal proteins โดย European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feeding stuffs (EURL-AP) ใน 1 ชุดประกอบด้วย 8 ตัวอย่าง ได้แก่

- รหัส N410 อาหารสำหรับสัตว์ปีก
- รหัส N990 และ N1782 อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีก
- รหัส N1594 และ N2074 อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีก และ 0.5% นมผง
- รหัส N1238 อาหารสำหรับสัตว์น้ำ
- รหัส N594 อาหารสำหรับสัตว์น้ำผสม 0.1% เนื้อและกระดูกปนสัตว์เคี้ยวเอื้อง
- รหัส N406 อาหารสำหรับสัตว์น้ำผสม 0.1% เนื้อและกระดูกปนสุกร

3.5.2 ตัวอย่างเนื้อสัตว์สำหรับทดสอบความชำนาญรายการ meat authenticity (beef) โดย Fapas ใน 1 ชุด ประกอบด้วย 1 ตัวอย่าง คือ เนื้อวัวผสมเนื้อหมูและเนื้อแกะ

3.5.3 ตัวอย่างอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- อาหารสำหรับสุนัขโตชนิดเนื้อ ยี่ห้อ S (เนื้อไก่ชิ้นในน้ำเกรวี่ รสเบคอนและไข่)

- อาหารสำหรับสุนัขชนิดเนื้อ ยี่ห้อ M (ไก่หน้าเนื้อเปิดในน้ำเกรวี่)
- ขนมห่านสำหรับแมวชนิดเม็ด ยี่ห้อ F (ทูน่า ไก่ และพืช)

3.5.4 ตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดเม็ด พ.ร.บ.ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ เนื้อและกระดูกป่น ซึ่งผ่านการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วพบการปลอมปนขนสัตว์ปีกปน

4. วิธีการทดลอง

4.1 ออกแบบชุด primers และ probe จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย ชุดที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไก่ (*Gallus gallus*) และชุดที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเป็ด (*Anas platyrhynchos*) โดยใช้ mtDNA ของยีนที่สนใจเป็น biomarker

4.1.1 ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับ species identification พร้อมเลือกยีนเป้าหมาย (target gene) ที่ใช้เป็น biomarker จากนั้นคัดเลือกข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของ target gene (DNA sequence) ของ ไก่ เป็ด และสัตว์ปีกชนิดอื่นที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียง ไก่ วง นกกระทา จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อใช้ในการออกแบบ primers และ probe ที่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของไก่ และที่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของเป็ด

4.1.2 นำ DNA sequence ในข้อ 4.1.1 มาเปรียบเทียบ (align) เพื่อหาตำแหน่ง DNA sequence ของไก่ที่แตกต่างกับของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น และตำแหน่งที่ DNA sequence ของเป็ดที่แตกต่างกับของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (non-conserved region) ด้วยโปรแกรม clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

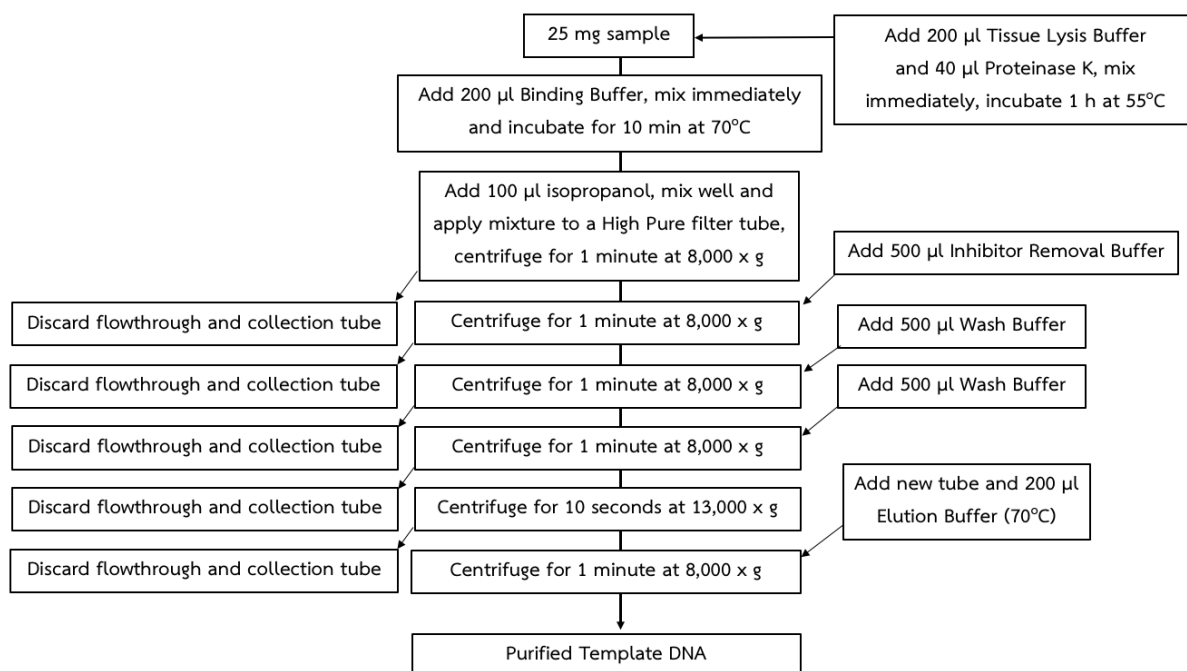
4.1.3 นำ non-conserved region ที่ได้ ไปใช้ในการออกแบบ primers และ probe ด้วยโปรแกรม primer quest tool (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) โดยกำหนดให้ PCR product หรือ amplicon size มีขนาด 80-150 bp ให้ primers มีขนาด 15-25 bp มี GC content อยู่ในช่วง 40-60% ไม่มี secondary structure probe มีขนาด 20-30 bp มี GC content 40-60 %

4.1.4 นำลำดับเบสของ primers และ probe รวมถึง PCR product ที่ได้จากการออกแบบของยีน *Cytb* ที่จำเพาะกับลำดับดีเอ็นเอของไก่ (Genbank accession number: NC_053523.1) และอีกชุดที่จำเพาะกับยีน *D-loop* ของเป็ด (GenBank accession number: MN734507.1) มาทดสอบความจำเพาะเชิงทฤษฎี (theoretical test for specificity) ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อให้มั่นใจว่า primers และ probe นั้นมีความจำเพาะกับไก่เท่านั้น และอีกชุดมีความจำเพาะกับเป็ดเท่านั้น ก่อนทำการสังเคราะห์ โดยในการสังเคราะห์ probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไก่ ได้มีการติดฉลากด้าน 5' ด้วยสี FAM และด้าน 3' ด้วย BHQ1 quencher ส่วน probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเป็ด ได้มีการติดฉลากด้าน 5' ด้วยสี HEX และด้าน 3' ด้วย BHQ1 quencher เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างของ PCR product ได้

4.2 พัฒนารูปแบบการสกัดสารพันธุกรรมของ เนื้อไก่ เนื้อเป็ด ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก ขนสัตว์ปีกปน

4.2.1 ทดสอบการสกัดสารพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ชนิดละ 3 ซ้ำ ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit เป็นวิธีหลัก ซึ่งมีขั้นตอนดังรูปที่ 1 โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ

เริ่มต้น 25 มิลลิกรัม จากนั้นวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง DNA quantifier ซึ่งหากได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 ng/ μ L ขึ้นไปและมีค่า A_{260}/A_{280} ตั้งแต่ 1.8 ขึ้นไป แสดงว่า DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างมีความบริสุทธิ์มีแนวโน้มที่จะสำเร็จในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Federal office of consumer protection and food safety, 2016) แล้วทดสอบการเกิดปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยชุด Foodproof[®] SL Chicken Species Detection Kit และ Foodproof[®] SL Duck Species Detection Kit



รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit (ดัดแปลงจาก Roche, 2019)

4.2.2 ทดสอบการสกัดสารพันธุกรรมของตัวอย่างขนสัตว์ปีกปน ซึ่งปรับเปลี่ยนขั้นตอนจากรูปที่ 1 โดยปรับเปลี่ยนระยะเวลาในขั้นตอนการบ่มหลังจากที่ใส่ tissue lysis buffer และ proteinase K โดยเพิ่มเวลาเป็น 4 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ รวมถึงเพิ่มขั้นตอนการเติม chloroform 500 ไมโครลิตร หลังการที่ใส่ tissue lysis buffer และ proteinase K แล้วตามด้วย centrifuge ที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดังตารางที่ 1 จากนั้นปิเปตส่วนใส (supernatant) ไปใช้ต่อ

ตารางที่ 1 การปรับเปลี่ยนขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม

	วิธี A	วิธี B	วิธี C	วิธี D	วิธี E	วิธี F
ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	1	1	4	4	16	16
chloroform 500 ไมโครลิตร	ไม่เติม	เติม	ไม่เติม	เติม	ไม่เติม	เติม

4.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

โดยเริ่มจากทดลองใช้ความเข้มข้นส่วนประกอบในน้ำยาและสภาวะของปฏิกิริยาตามคำแนะนำของชุดน้ำยา LightCycler480® Probes Master (Roche, 2017) ดังตารางที่ 2 และ 3 แล้วทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาโดยปรับเปลี่ยน 3 พารามิเตอร์ ได้แก่ 1) ความเข้มข้นสุดท้ายของ primers และ/หรือ probe 2) จำนวนรอบของขั้นตอน amplification 3) อุณหภูมิขั้น annealing โดยปรับเพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาโดยจำแนกชนิดของไก่และชนิดของเป็ดได้ และมีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตเพียง 2 ชนิดนี้เท่านั้น

ตารางที่ 2 ส่วนผสมน้ำยาในการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR ตามชุดทดสอบ

Reagents	Amount per 1 reaction (μL)
2X ProbeMaster	10
10 μM Chicken-Cytb forward primer	1
10 μM Chicken-Cytb reverse primer	1
10 μM Chicken-Cytb probe	0.5
10 μM Duck-D-loop forward primer	1
10 μM Duck-D-loop reverse primer	1
10 μM Duck-D-loop probe	0.5
DNA template	5
Total volume	20

ตารางที่ 3 สภาวะในการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR ตามชุดทดสอบ

Program	Target (°C)	Hold	Cycle
Pre-incubation	95	10 minutes	1
Amplification	Denature	95	10 seconds
	Annealing	60	30 seconds
	Extension	72	10 seconds
Cooling	40	10 seconds	1

4.4 ทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

ทดสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้กับเนื้อสัตว์ที่ไม่ใช่ไก่และเป็ด (non-target species) และพืชที่มักพบในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูป รวม 12 ชนิดเพื่อตรวจสอบ unexpected cross-reactions with non-target DNA ซึ่งหากวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะกับไก่และเป็ด (target species) จริง จะต้องไม่มีผลบวกปลอม (false positive) และไม่มีผลลบปลอม (false negative) พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป

4.5 ทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ (sensitivity)

4.5.1 เตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ด 7 ระดับความเข้มข้น

ใช้เนื้อและกระดูกไก่ เนื้อและกระดูกเป็ด อบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นบดเป็นผงละเอียด ผสมในอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคที่ผ่านการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปแล้วว่าไม่พบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D mixer โดยใช้วิธี 2-fold trituration (Nakamura *et al.*, 2004) เพื่อให้ได้อาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ด 7 ระดับความเข้มข้น (%w/w) ดังตารางที่ 4

เมื่อเตรียมตัวอย่าง I เสร็จแล้วจะมีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ก่อนนำไปใช้เตรียมเป็นตัวอย่าง II และเมื่อเตรียมตัวอย่าง II เรียบร้อย จะทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ก่อนนำไปใช้เตรียมเป็นตัวอย่าง III และ IV จากนั้นทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง III และ IV ก่อนนำตัวอย่าง IV ไปใช้เตรียมเป็นตัวอย่าง V, VI และ VII ซึ่งมีขั้นตอนดังตารางที่ 4 ทั้งนี้ไม่ได้ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง V, VI และ VII เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นต่ำกว่ากว่า limit of detection ของชุดทดสอบในข้อ 1.8 และ 1.9

ตารางที่ 4 วิธีเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และผลพลอยได้จากเป็ด 7 ระดับความเข้มข้น

ขั้นตอน	ตัวอย่าง I (1%)	ตัวอย่าง II (0.1%)	ตัวอย่าง III (0.05%)	ตัวอย่าง IV (0.01%)	ตัวอย่าง V (0.005%)	ตัวอย่าง VI (0.002%)	ตัวอย่าง VII (0.001%)
	100 กรัม	50 กรัม	20 กรัม	50 กรัม	20 กรัม	20 กรัม	50 กรัม
1	1 g ไก่+1 g เป็ด +2 g feed	5 g ตัวอย่าง I +5 g feed	10 g ตัวอย่าง II+10 g feed	5 g ตัวอย่าง II +5 g feed	10 g ตัวอย่าง IV+10 g feed	4 g ตัวอย่าง IV +4 g feed	5 g ตัวอย่าง IV +5 g feed
2	ผสม 30 นาที		N/A	ผสม 30 นาที	N/A	ผสม 30 นาที	
3	+ 4 g feed	+10 g feed	N/A	+10 g feed	N/A	+8 g feed	+10 g feed
4	ผสม 30 นาที		N/A	ผสม 30 นาที	N/A	ผสม 30 นาที	
5	+8 g feed	+20 g feed	N/A	+20 g feed	N/A	+4 g feed	+20 g feed
6	ผสม 30 นาที		N/A	ผสม 30 นาที	N/A		ผสม 30 นาที
7	+ 16 g feed	+10 g feed	N/A	+10 g feed	N/A		+10 g feed
8	ผสม 30 นาที	N/A					
9	+ 32 g feed	N/A					
10	ผสม 30 นาที	N/A					
11	+ 36 g feed	N/A					
12	ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที						
13	ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง				N/A		

หมายเหตุ Not applicable; N/A

สำหรับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง (homogeneity) ได้ทำการทดสอบตัวอย่าง I, II, III และ IV โดยแบ่งแต่ละตัวอย่างออกเป็นถุงย่อย อย่างน้อย 20 ถุง จากนั้นสุ่มตัวอย่างละ 10 ถุง และสกัดสารพันธุกรรมถุงละ 2 ซ้ำ รวมตัวอย่างละ 20 ซ้ำ ตามวิธีที่ได้จากข้อ 4.2 และทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของไก่และเป็ดตามวิธี ISO13528 (2015) ดังตารางที่ 5 เพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นนั้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (ISO13528, 2015) โดยหากผลการทดสอบทั้ง 20 ซ้ำของแต่ละตัวอย่างให้ผลพบสารปนเปื้อนของไก่และเป็ด ถือว่าตัวอย่างนั้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (Fumiere *et al.*, 2021)

ตารางที่ 5 แนวทางการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างและผลที่คาดหวัง

ตัวอย่าง	ส่วนผสม	PCR results by test kit		
		จำนวน ซ้ำ	Chicken DNA	Duck DNA
I	อาหารสัตว์ผสม 1% ผลพลอยได้จากไก่และ 1% ผลพลอยได้จากเป็ด	20	D	D
II	อาหารสัตว์ผสม 0.1% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.1% ผลพลอยได้จากเป็ด	20	D	D
III	อาหารสัตว์ผสม 0.05% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.05% ผลพลอยได้จากเป็ด	20	D	D
IV	อาหารสัตว์ผสม 0.01% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.01% ผลพลอยได้จากเป็ด	20	D	D
V	อาหารสัตว์ผสม 0.001% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.001% ผลพลอยได้จากเป็ด		N/A	
VI	อาหารสัตว์ผสม 0.002% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.002% ผลพลอยได้จากเป็ด		N/A	
VII	อาหารสัตว์ผสม 0.001% ผลพลอยได้จากไก่และ 0.001% ผลพลอยได้จากเป็ด		N/A	

หมายเหตุ Detected; D หมายถึง พบ Not detected; ND หมายถึง ไม่พบ N/A; not applicable

4.5.2 ทดสอบหาความไว (sensitivity)

ทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ด 7 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมได้จากข้อ 4.5.1 กับวิธีวิเคราะห์ โดยทดสอบระดับความเข้มข้นละ 12 ซ้ำของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลบวกทั้ง 12 ซ้ำ จะถูกพิจารณาเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ของวิธีวิเคราะห์

4.6 ทดสอบตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ วัตถุดิบอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยวิธี multiplex real-time PCR

4.6.1 ทดสอบวิธีตรวจหาพันธุกรรมของไก่และเป็ดที่ได้กับอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ 4 ชนิด

ทดสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้กับอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด สุกร และโค และวัตถุดิบอาหารสัตว์ 1 ชนิด คือ ปลาป่น ที่ส่งมาวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ที่สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ชนิดละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 150 ตัวอย่างทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

โดยควบคุมคุณภาพ 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย

1) ขั้นการสกัดสารพันธุกรรม ใช้ตัวอย่างควบคุมบวก (positive extraction control) ซึ่งเป็นอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ดในระดับ sensitivity ซึ่งได้จากการเตรียมในข้อ 4.5.1 และตัวอย่างควบคุมลบ (negative extraction control) ซึ่งเป็นอาหารสัตว์ที่ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ด ใช้สกัดพร้อมกับการสกัดสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

2) ขั้น multiplex real-time PCR ใช้ตัวอย่างควบคุมปฏิกิริยาบวก ซึ่งเป็น DNA ที่สกัดได้จากเนื้อไก่ และสกัดได้จากเนื้อเป็ด ผ่านการทดสอบ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปแล้วพบว่าเป็น DNA ไก่จริง และ

เป็น DNA เป็ดจริงและตัวอย่างควบคุมปฏิกิริยาลบ (no template control) ซึ่งเป็น master mix ที่เติมน้ำแทน DNA ของตัวอย่าง

4.6.2 ทดสอบตัวอย่างอื่น ๆ ด้วยวิธี multiplex real-time PCR

ทำการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ดังข้อ 4.6.1 กับตัวอย่างอื่น ๆ 4 ชุด รายละเอียดดังข้อ 3.5 โดยทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การออกแบบชุด primers และ probe

จากการออกแบบชุด primers และ probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไก่ (*Gallus gallus*) จำนวน 1 ชุด และชุด primers และ probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเป็ด (*Anas platyrhynchos*) จำนวน 1 ชุด พบว่ายีน *Cytb* มีความจำเพาะกับลำดับดีเอ็นเอของไก่ ส่วนยีน *D-loop* นั้นมีความจำเพาะกับลำดับดีเอ็นเอของเป็ด ซึ่งสามารถนำมาออกแบบชุด primers และ probe ได้ดังตารางที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arslan และคณะ (2006) กับ Pegels และคณะ (2012) ที่พบว่าสามารถใช้ ยีน *Cytb* และ *D-loop* เป็น biomarker สำหรับระบุชนิดสิ่งมีชีวิตได้ตามลำดับ

ตารางที่ 6 Primers and probes (5'-3') of the multiplex real-time PCR

Name	Sequence	Target	Amplicon size (bp)
Chicken- <i>Cytb</i> forward primer	TCTGCCTCATGACCCAAATC	Chicken- <i>Cytb</i>	116
Chicken- <i>Cytb</i> reverse primer	TCAGCCGTATTGTACGTTCC		
Chicken- <i>Cytb</i> probe	FAM-AGGGATGTGTCTGCTGTGTAGTGC-BHQ1		
Duck- <i>D-loop</i> -Forward	GACCCAGAGTGAATGCTCTAAT	Duck- <i>D-loop</i>	116
Duck- <i>D-loop</i> -Reverse	TTTGAGTGTTGGTAGGGTATG		
Duck- <i>D-loop</i> -Probe	HEX-CCAACCAGAACAAAGGCCCCATAATGA-BHQ1		

หมายเหตุ BHQ1 คือ black hole quencher 1

2. การพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากเนื้อไก่ เนื้อเป็ด ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก และขนสัตว์ปีกปน

2.1 จากการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit พบว่า เนื้อไก่ เนื้อเป็ด ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกให้ DNA เข้มข้นตั้งแต่ 19.3 ng/ μ L ขึ้นไปถึง 219.3 ng/ μ L มีค่า A_{260}/A_{280} ตั้งแต่ 1.89 ขึ้นไป บ่งบอกว่า DNA มีความเข้มข้นสูงและมีความบริสุทธิ์ และพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้จริงเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป ดังตารางที่ 7 ส่วนตัวอย่างขนสัตว์ปีกปนนั้นได้ yield น้อยกว่า 10 ng/ μ L ให้อัตราส่วน A_{260}/A_{280} น้อย ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่ต่ำ และเมื่อทำปฏิกิริยา PCR พบว่าไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit และทำ real-time PCR ด้วยชุด Foodproof® SL (Chicken Species Detection Kit และ Duck Species Detection Kit) และ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ของตัวอย่าง 4 ชนิด

ตัวอย่าง	ผลการสกัด DNA		ผลการทำ real-time PCR			
	ความเข้มข้น (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	DNA test kit chicken	DNA test kit duck	Multiplex chicken	Multiplex duck
เนื้อไก่	40.7-71.3	1.92-2.02	D	ND	D	ND
เนื้อเป็ด	110.0-219.3	1.95-2.04	ND	D	ND	D
ผลพลอยได้ จากสัตว์ปีก	19.3-59.4	1.89-1.96	D	ND	D	ND
ขนสัตว์ปีกปน	4.6-8.7	1.33-1.49	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ Detected; D หมายถึง พบ Not detected; ND หมายถึง ไม่พบ

2.2 ทดสอบการสกัดสารพันธุกรรมของตัวอย่างขนสัตว์ปีกปน โดยเพิ่มขั้นตอนการสกัดของรหัสตัวอย่าง A1-A3, B1-B3, C1-C3, D1-D3, E1-E3 และ F1-F3 หมายถึงตัวอย่างที่ทดสอบตามวิธี A, B, C, D, E และ F ในตารางที่ 1 ตามลำดับ พบว่าการบ่มด้วย tissue lysis buffer และ proteinase K ซึ่งเป็นขั้นตอนการย่อยตัวอย่างให้นานขึ้นนั้นช่วยให้เซลล์แตกได้ดีขึ้นและสามารถสกัด DNA ออกจากตัวอย่างได้มากขึ้น ส่วนการเติม chloroform แล้วปั่นเหวี่ยงช่วยทำให้การแยกชั้น DNA กับชั้นสารอินทรีย์ดียิ่งขึ้น โดยสารรบกวนจะอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ทำให้เพิ่มโอกาสได้ DNA ที่ต้องการได้มากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pegels และคณะ (2012) ที่ได้มีการบ่มตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วย lysis buffer และ proteinase K ข้ามคืนแล้วแยกชั้น DNA ด้วยการเติม chloroform ในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม

โดยตัวอย่างผลพลอยได้จากสัตว์ปีกและขนสัตว์ปีกปนนั้น เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผ่านกระบวนการผลิตภายใต้ความร้อนหรือแรงดันสูง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560) ส่งผลให้เกิดการสลายของเนื้อเยื่อรวมถึงแตกหักของ DNA (DNA degradation) ทำให้ได้ DNA ที่แตกหักและเกิดปฏิกิริยา real-time PCR ได้ยาก แต่ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกนั้น มีส่วนประกอบของเนื้อและกระดูก โดยกระดูกเป็นอวัยวะที่มีแร่ธาตุ

ซึ่งช่วยในการคงสภาพของ DNA ได้ (Jakubowska *et al.*, 2012) จึงสกัด DNA จากผลพลอยได้จากสัตว์ปีก (เนื้อและกระดูก) ได้ง่ายกว่าตัวอย่างขนสัตว์ปีกปน ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการสกัดสารพันธุกรรมจากขนสัตว์ปีกปนด้วยวิธีดัดแปลงจากการใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit และทำ real-time PCR ด้วยชุด Foodproof® SL (Chicken Species Detection Kit และ Duck Species Detection Kit) และ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่าง	ผลการสกัด DNA		ผลการทำ real-time PCR			
	ความเข้มข้น (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA test kit		Multiplex	
			chicken	duck	chicken	duck
A1-A3	4.6-8.7	1.33-1.49	ND	ND	ND	ND
B1-B3	5.3-8.2	1.50-1.71	ND	ND	ND	ND
C1-C3	1.6-2.2	1.23-1.36	ND	ND	ND	ND
D1-D3	2.0-2.2	1.16-1.32	ND	ND	ND	ND
E1-E3	7.8-8.7	1.80-1.89	ND	ND	ND	ND
F1-F3	10.5-16.8	1.70-1.95	D	ND	D	ND

หมายเหตุ Detected; D หมายถึง พบ Not detected; ND หมายถึง ไม่พบ

ทำให้สรุปได้ว่าสามารถใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม high pure PCR template prep kit สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกได้โดยตรง ซึ่งให้ความเข้มข้นของ DNA มากกว่า 10 ng/μL และมีความบริสุทธิ์ สามารถเกิดปฏิกิริยา real-time PCR ได้ ส่วนตัวอย่างขนสัตว์ปีกปนนั้นต้องเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม tissue lysis buffer และ proteinase K เป็น 16 ชั่วโมง ตามด้วยเติม chloroform 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 x g นาน 5 นาที

3. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR

ได้มีการปรับลดความเข้มข้นสุดท้ายของ primers และ probe เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ชุดทดสอบแนะนำนั้นมากเกินไปสำหรับ primers และ probe ที่ใช้ และได้ลดจำนวนรอบในขั้น amplification จาก 45 รอบ เป็น 35 รอบ ช่วยให้ประหยัดเวลาในการทดสอบและเพิ่มอุณหภูมิขั้น annealing ซึ่งเป็นขั้นที่ primers จะจับกับ target DNA จาก 60 องศาเซลเซียส เป็น 64 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้ primers สามารถจับกับ target DNA อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่ม specificity ของ primers ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำยาและสถานะที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR ดังตารางที่ 9 และ 10 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอไก่และเป็ดได้

ตารางที่ 9 ปริมาณและความเข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR

Reagents	Amount per 1 reaction(μL)
2X ProbeMaster	10
Water, PCR grade	2
10 μM Chicken-Cytb forward primer	0.5
10 μM Chicken-Cytb reverse primer	0.5
2 μM Chicken-Cytb probe	0.5
10 μM Duck-D-loop forward primer	0.5
10 μM Duck-D-loop reverse primer	0.5
2 μM Duck-D-loop probe	0.5
DNA template	5
Total volume	20

ตารางที่ 10 สภาพที่เหมาะสมในการทำ multiplex real-time PCR

Program	Target (°C)	Hold	Cycle
Pre-incubation	95	10 minutes	1
Amplification	Denature	95	10 seconds
	Annealing	64	30 seconds
	Extension	72	10 seconds
Cooling	40	10 seconds	1

4. ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการทดสอบความจำเพาะของวิธี multiplex real-time PCR กับตัวอย่างเนื้อสัตว์ 8 ชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด นกกระทา ปลาทุ วัว หมู กบ จระเข้ ตัวอย่างพืช 6 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวสาลี ข้าว และข้าวบาร์เลย์ พบว่า วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดได้ถูกต้อง เช่นเดียวกับชุด Foodproof® SL Chicken Species Detection Kit และ Foodproof® SL Duck Species Detection Kit ดัง**ตารางที่ 11** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไก่และสารพันธุกรรมของเป็ดจริง

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับ real-time PCR ด้วยชุด Foodproof® SL (Chicken Species Detection Kit และ Duck Species Detection Kit)

Common name	Scientific name	Multiplex method		DNA test kit	
		chicken	duck	chicken	duck
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	D	ND	D	ND
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i>	ND	D	ND	D
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	ND	ND	ND	ND
Mackerel	<i>Rastrelliger brachysoma</i>	ND	ND	ND	ND
Cattle	<i>Bos taurus</i>	ND	ND	ND	ND
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	ND	ND	ND	ND
Frog	<i>Rana sp.</i>	ND	ND	ND	ND
Crocodile	<i>Crocodylus sp.</i>	ND	ND	ND	ND
Maize	<i>Zea mays</i>	ND	ND	ND	ND
Soybean	<i>Glycine max</i>	ND	ND	ND	ND
Green bean	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ND	ND	ND	ND
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	ND	ND	ND	ND
Rice	<i>Oryza sativa</i>	ND	ND	ND	ND
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ Detected; D หมายถึง พบ Not detected; ND หมายถึงไม่พบ

5. ทดสอบความไว (sensitivity)

จากการทดสอบด้วยสถานะของปฏิกิริยา multiplex real-time PCR ดัง**ตารางที่ 9** และ **10** กับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ด 7 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมได้จาก ข้อ 4.5 พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่ (%w/w) ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.005% ส่วนระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากเป็ดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.002% ดังแสดงใน**ตารางที่ 12**

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

รหัส	ตัวอย่าง	Chicken detection		Duck detection	
		Average Cp (n=12)	SD	Average Cp (n=12)	SD
I	อาหารสัตว์ผสม 1% ผลพลอยได้จากไก่ และ 1% ผลพลอยได้จากเป็ด	20.45	0.21	18.71	0.38
II	อาหารสัตว์ผสม 0.1% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.1% ผลพลอยได้จากเป็ด	24.01	0.13	22.43	0.07
III	อาหารสัตว์ผสม 0.05% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.05% ผลพลอยได้จากเป็ด	25.75	0.28	24.03	0.27
IV	อาหารสัตว์ผสม 0.01% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.01% ผลพลอยได้จากเป็ด	27.19	0.18	25.67	0.05
V	อาหารสัตว์ผสม 0.005% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.005% ผลพลอยได้จากเป็ด	28.34	0.27	26.66	0.09
VI	อาหารสัตว์ผสม 0.002% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.002% ผลพลอยได้จากเป็ด	ND	-	27.94	0.09
VII	อาหารสัตว์ผสม 0.001% ผลพลอยได้จากไก่ และ 0.001% ผลพลอยได้จากเป็ด	ND	-	ND	-
-	อาหารสัตว์	ND	-	ND	-

หมายเหตุ Not detected; ND หมายถึง ไม่พบ Standard deviation; SD หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 12 ซ้ำ Crossing point; Cp

6. การทดสอบอาหารสัตว์สำเร็จรูปและวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปและวัตถุดิบอาหารสัตว์ 5 ชนิด จำนวนชนิดละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 150 พบสารพันธุกรรมของไก่ 5.33% (8/150) และไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด โดยแบ่งเป็น

- ในอาหารสำเร็จรูปสำหรับโค พบสารพันธุกรรมของไก่ 16.67% (5/30) ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด
- ในอาหารสำเร็จรูปสำหรับสุกร พบสารพันธุกรรมของไก่ 3.3% (1/30) ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด
- ในอาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่ ไม่พบสารพันธุกรรมของไก่ (0/30) ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด
- ในอาหารสำเร็จรูปสำหรับเป็ด พบสารพันธุกรรมของไก่ 3.3% (1/30) ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด
- ในปลาปน พบสารพันธุกรรมของไก่ 3.3% (1/30) ไม่พบสารพันธุกรรมของเป็ด ดังสรุปในตารางที่ 13

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดในคราวเดียวกันในตัวอย่างอาหารสัตว์สำเร็จรูปและวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ โดยพบสารพันธุกรรมของไก่ในอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคมากที่สุด เนื่องจากมีส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารสัตว์หลายชนิดรวมไปถึงขนสัตว์ปีกปนและผลพลอยได้จากสัตว์ปีก (Levalley, 2014) สอดคล้องกับการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มักพบขนสัตว์ปีกปนและผลพลอยได้จากสัตว์ปีก ซึ่งในทางปฏิบัตินั้น การจำแนกชนิดของสัตว์จากกระดูกและกล้ามเนื้อนั้นทำได้ยาก ดังนั้นการประยุกต์ใช้การตรวจหาสารพันธุกรรมจึงสามารถช่วยให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่าง	จำนวน	Multiplex method	
		Chicken (พบ/ตรวจ)	Duck (พบ/ตรวจ)
อาหารสำเร็จรูปสำหรับโค	30	5/30	0/30
อาหารสำเร็จรูปสำหรับสุกร	30	1/30	0/30
อาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่	30	0/30	0/30
อาหารสำเร็จรูปสำหรับเป็ด	30	1/30	0/30
ปลาปน	30	1/30	0/30
รวม	150	8/150	0/150

7. ผลการทดสอบตัวอย่างอื่น ๆ ด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบวิธี multiplex real-time PCR กับตัวอย่างทั้ง 4 ชุด ดังรายละเอียดในข้อ 3.5 พบว่าสามารถให้ผลการทดสอบตรงตามทุกตัวอย่าง ดัง**ตารางที่ 14** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้นอกจากสามารถใช้ทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์แล้ว ยังสามารถใช้ทดสอบตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Scholtens และคณะ (2017) ที่สามารถใช้วิธีวิเคราะห์สารพันธุกรรมในอาหารสัตว์ ทดสอบตัวอย่างเนื้อสัตว์ได้

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบตัวอย่างอื่น ๆ ด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับ real-time PCR ด้วยชุด Foodproof® SL (Chicken Species Detection Kit และ Duck Species Detection Kit)

Sample description	Code	Multiplex method		DNA test kit	
		chicken	duck	chicken	duck
อาหารสำหรับสัตว์ปีก (EURL-AP)	N410	ND	ND	ND	ND
อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีก (EURL-AP)	N990	D	ND	D	ND
อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีก (EURL-AP)	N1782	D	ND	D	ND
อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีกและ 0.5% นมผง (EURL-AP)	N1594	D	ND	D	ND
อาหารสำหรับสัตว์ปีกผสม 0.5% เนื้อและกระดูกปนสัตว์ปีกและ 0.5% นมผง (EURL-AP)	N2074	D	ND	D	ND
อาหารสำหรับสัตว์น้ำ (EURL-AP)	N1238	ND	ND	ND	ND
อาหารสำหรับสัตว์น้ำผสม 0.1% เนื้อและกระดูกปนสัตว์เคี้ยวเอื้อง (EURL-AP)	N594	ND	ND	ND	ND
อาหารสำหรับสัตว์น้ำผสม 0.1% เนื้อและกระดูกปนสุกร (EURL-AP)	N406	ND	ND	ND	ND
เนื้อโคผสมเนื้อสุกรและเนื้อแกะ (Fapas)	2991	ND	ND	ND	ND
อาหารสำหรับสุนัขโตชนิดเนื้อ (เนื้อไก่ชิ้นในน้ำเกรวี่ รสเบคอนและไข่)	S	D	ND	D	ND
อาหารสำหรับสุนัขชนิดเนื้อ (ไก่หน้าเนื้อเปิดในน้ำเกรวี่)	M	D	D	D	D
ขนมสำหรับแมวชนิดเม็ด (ทูน่า ไก่ และพืช)	F	D	ND	D	ND
เนื้อและกระดูกปน พบการปลอมปนขนสัตว์ปีกปน	A02292/64	D	ND	D	ND

หมายเหตุ Detected; D หมายถึง พบ Not detected; ND หมายถึง ไม่พบ

สรุปผลการทดลอง

จากการออกแบบ primers และ probe จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของไก่และจำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมของเป็ดพบว่ายีน *Cytochrome B* สามารถใช้เป็น biomarker สำหรับไก่ได้ ส่วนยีน *Displacement loop* สามารถใช้เป็น biomarker สำหรับเป็ดได้ สำหรับการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลพลอยได้จากสัตว์ปีกสามารถใช้วิธีตามคำแนะนำของชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูปได้โดยตรง ส่วนตัวอย่างขนสัตว์ปีกปนต้องเพิ่มเวลาในการบ่ม tissue lysis buffer และ proteinase K เป็น 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform 500 ไมโครลิตร ตามด้วยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที สำหรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR นั้นสามารถลดความเข้มข้นของ primers และ probe ลงเมื่อเทียบกับคำแนะนำของชุดทดสอบ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และลดจำนวนรอบในปฏิกิริยา PCR ซึ่งช่วยประหยัดเวลาในการทดสอบ สำหรับการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่และเป็ด พบว่าวิธี 2-fold trituration ด้วยการใช้เครื่องผสมตัวอย่างอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D mixer มีประสิทธิภาพสามารถเตรียมตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ วิธีวิเคราะห์ที่ได้ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ มีความจำเพาะต่อไก่และเป็ด มีความไวสูง โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากไก่ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.005% (w/w) ส่วนระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารสัตว์ผสมผลพลอยได้จากเป็ดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.002% (w/w) เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ขนสัตว์ปีกปนในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ สนับสนุนการศึกษาลักษณะกล้ามเนื้อและกระดูกของสัตว์ปีกได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องเมื่อทดสอบกับตัวอย่างทดสอบความชำนาญรายการอาหารสัตว์และตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไก่และเป็ดในเนื้อสัตว์และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงได้ด้วย

ข้อเสนอแนะ

ควรนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปทดสอบให้ครบตาม parameter ของ method validation และต่อยอดเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณในอนาคต และควรเพิ่มการใช้ internal control เพื่อควบคุมคุณภาพขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ในการวิเคราะห์อาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง และพัฒนาการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากนี้ยังนำวิธีการเตรียมตัวอย่างจากการศึกษามาเตรียมเป็น reference material อาหารสัตว์ผสมสิ่งปลอมปนได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.พัชรี ทองคำคุณ อดีตผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ผู้คอยให้คำแนะนำและการสนับสนุนในการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ น.สพ.เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ Dr. Pascal Veys, Deputy Director of European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feeding stuffs, Head of microscopy laboratory สำหรับคำแนะนำในการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม processed animal proteins ให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน

ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ งานทดสอบกายภาพ งานทดสอบจุลชีววิทยา งานทดสอบพิษวิทยาและชีวเคมี เจ้าหน้าที่ห้องบดตัวอย่าง โดยเฉพาะนายพงษ์เทพ เวียงวะลัย นางสาวรัฐกานต์ ศรีศิริ นางสาวยุพา จันทร์คำทรัพย์ สำหรับการสนับสนุนในการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2558ก. **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์หมวด 8 การควบคุม**

คุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132/ตอนที่15ก/หน้า 13-14

5 มีนาคม 2558

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2558ข. **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์หมวด 8 การควบคุมคุณภาพ**

อาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132/ตอนพิเศษ322ง/หน้า 11-12

4 ธันวาคม 2558

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2560. **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดลักษณะและเงื่อนไข**

ของอาหารสัตว์ที่ห้ามนำเข้าซึ่งมีความเสี่ยงต่อโรคไข้หวัดนก พ.ศ. 2560

ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134ตอนพิเศษ 155 ง/หน้า 34 9 มิถุนายน 2560

กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์. 2564. ราคาปลาป่นและปริมาณนำเข้า-ส่งออก. **กรมการค้าภายใน.**

สืบค้นจาก http://agri.dit.go.th/index.php/departement_doc/3/ราคาปลาป่นและปริมาณนำเข้า-ส่งออก/72[25 กุมภาพันธ์ 2564].

วรพันธุ์ จินตณวิทย์. 2553. แนใจแล้วหรือกับคุณภาพอาหารสัตว์. **วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์,**

ปีที่ 36 (144) : 42-50.

สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2564. ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์. **สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย.**

สืบค้นจาก <http://www.thaifeedmill.com/ราคาPrice/tabid/78/Default.aspx>[1กุมภาพันธ์ 2564].

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. 2561. สัดส่วนปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์

อาหารสัตว์เลี้ยง ปี 2561. **สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์.**

สืบค้นจาก <http://certify.dld.go.th/certify/index.php/th/2016-05-01-14-50-24/104-2555-2559/1064-2561>[20มกราคม2564].

Arslan, A., O. Irfan Ilhak, and M. Calicioglu. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. **Meat science**, 72, 326–330.

- Aslan, O., R. Hamill, T. Sweeney, W. Reardon, and A. Mullen. (2009). Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability. **Journal of animal science**, 87, 57–61.
- Brooker, R. (2017). Genetics: Analysis and principles (6th ed.). **McGraw-Hill Education**.
- European Commission. (2009). Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal byproducts and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). **Official Journal of the European Communities**, L150, 10-15.
- Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. (2016). Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods. 1-15.
- Fumiere, O., P. Veys and A. Marien. (2021). Combined microscopy-PCR EURL-AP Proficiency Test 2021: Final version. **CRA-W**. 8-19.
- Galimberti, A., F. De Mattia, A. Losa, I. Bruni, S. Federici, M. Casiraghi, S. Martellos, M. Labra. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food research international** 50: 55–63.
- ISO 13528: 2015. (2015). Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.
- Jakubowska, J., A. Maciejewska and R. Pawlowski (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. **International Journal of Legal Medicine**, 126, 173-178.
- Levalley, S. (2014). Feed composition for cattle and sheep. **Colorado State University Extension**, 10(99).
- Liao, J., Y. Liu, L. Yang, F. Li and A. Sheppard. (2017). Development of a rapid mitochondrial DNA extraction method for species identification in milk and milk products. **Journal of dairy science**, 100, 7035–7040.
- Linacre, A., and J. Chun-I Lee, J. (2016). Species Determination: The Role and Use of the Cytochrome b Gene. **Methods in molecular biology**, 1420, 287–296.
- Mane, G., S. Mendiratta and A. Tiwari. (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. **Food chemistry**, 116, 806–810.

- Mueller, R., T.Olivry and P. Prélaud. (2016). Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. **Biomedical central veterinary research**, 12, 9.
- 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,
- Natonek-Wiśniewska, M. Ł. and P. Krzyścin. (2019). Detection of the Species Composition of Food Using Mitochondrial DNA: Challenges and Possibilities of a Modern Laboratory. **IntechOpen**, 1–12.
- Pegels, N., I. González, I. López-Calleja, S. Fernández, T. García and R. Martín. (2012). Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. **Poultry science**, 91, 1709–1719.
- Roche, (2017). LightCycler 480 Probes Master. Germany. (Mimeographed)
- Roche, (2019). Hight Pure PCR Template Preparation Kit. Germany. (Mimeographed)
- Scholtens, I., T. Prins. and L. Raamsdonk. (2017). Specificity of a novel TaqMan PCR method for detection of poultry DNA. **Food Control**, 73, 532–539.
- The Netherlands food and consumer product safety authority. (2013). Multi annual national control plan, **the Netherlands, annual report 2013**
- Tsuji, S., Y. Iguchi, N. Shibata, I. Teramura, T. Kitagawa and H. Yamanaka. (2018). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species. **Scientific Report**, 8.
- Yang, F., F. Ding, H. Chen, M. He, S. Zhu, X. Ma, L. Jiang, and H. Li. (2018). DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018, 2.