

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ใน อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยเทคนิค Multiplex

Real-time PCR

ณัฐพล เลี้ยงเพชร* พลิศา มหาชัย

บทคัดย่อ

จากปัญหาเรื่องการระบาดของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ในทั่วโลก และมีรายงานการพบการระบาดของโรคข้ามสายพันธุ์สัตว์ อาทิเช่น โค แพะ แกะ สุกร แมว เป็นต้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือ การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR เมื่อทำการออกแบบและตรวจสอบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene มีค่า C_t อยู่ในช่วง 19.21 - 21.13 สามารถนำมาใช้เป็น internal control ได้ และเทคนิค Multiplex Real-time PCR นี้ สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงได้ถูกต้อง โดยมีระดับปริมาณต่ำสุด ที่ตรวจวัดได้ของโค ม้า และสุกรเท่ากับ 0.1% w/w และมีค่า cut-off ในการตรวจหาโค ม้า และสุกร อยู่ที่ 38, 37 และ 37 ตามลำดับ วิธีนี้มีความจำเพาะต่อโค ม้า และสุกร ไม่พบการ cross-reactivity กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของแกะ แพะ และกระบือ และวัตถุดิบอาหารสัตว์ ผลตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ามีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าประสิทธิภาพ ของทั้งโค ม้า และสุกรอยู่ที่ 100% นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างทดสอบความชำนาญ พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ (satisfactory) และทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง จำนวน 120 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของโคในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคจำนวน 11 ตัวอย่าง และในอาหารสัตว์เลี้ยงจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.50% ดังนั้นวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงตรวจสอบนี้ มีความเหมาะสมสำหรับตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558

คำสำคัญ : โรควัวบ้า อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค อาหารสัตว์เลี้ยง Multiplex Real-time PCR

เลขทะเบียนวิชาการ: 68(2)-0304-018

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

* ผู้รับผิดชอบ, e-mail: liangpetch.nat@gmail.com

Method development and validation of bovine, horse and porcine DNA in cattle feed and pet food using Multiplex Real-time PCR technique

Nattapol Liangpetch* Palisa Mahachai

Abstract

The global spread of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and its cross-species transmission to various animals, including cattle, goats, sheep, pigs and cats. This study aimed to develop and validate a method for detecting bovine, horse and porcine DNA in cattle feed and pet food using Multiplex Real-time PCR. In the development and evaluation of primers and probes targeting the 18S rRNA gene, threshold cycles (C_t) values ranging from 19.21 to 21.13 can function as an internal control. Multiplex Real-time PCR technique can detect bovine, horse and porcine DNA contamination at a limit of detection (LOD) of 0.1% w/w. The cut-off values for detection of bovine, horse and porcine DNA were 38, 37 and 37 respectively. This method demonstrated specificity for bovine, horse and porcine exhibiting no cross-reactivity when evaluated against samples containing DNA derived from ovine, goat and buffalo as well as various feedstuff. Validation outcomes demonstrated 100% sensitivity, specificity and efficiency for detecting bovine, horse and porcine DNA. Furthermore, the method's results were satisfactory with proficiency test samples. 120 samples of cattle feed and pet food were analyzed. 12.50% were found to contain bovine DNA contamination in cattle feed (11 samples) and pet food (4 samples). No horse or porcine DNA contamination was detected. This method is suitable for detecting contamination of bovine, horse and porcine DNA in cattle feed and pet food. Consequently, the method for detecting contamination of bovine, horse and porcine DNA in cattle feed and pet food is suitable to monitor and investigate contamination in accordance with the Animal Feed Quality Control Act B.E. 2558 (A.D. 2015).

Keywords: BSE, cattle feed, pet food, Multiplex Real-time PCR

Registered No. : 68(2)-0304-018

Bureau of Quality Control of Livestock Products, 91 Moo 4, Tiwanon road, Bang kadi, Mueang, Pathumthani 12000

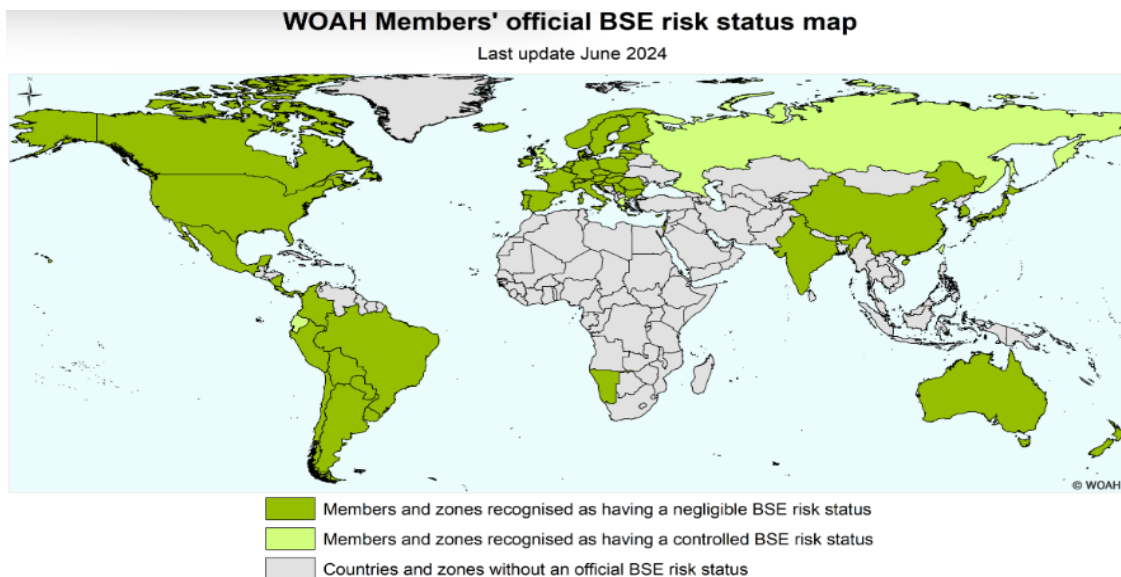
* Corresponding author, e-mail: liangpetch.nat@gmail.com

บทนำ

โรควัวบ้า หรือ Bovine spongiform encephalopathy Disease (BSE) เป็นโรคระบาดจากสัตว์สู่สัตว์ผ่านทางอาหารสัตว์ (feedborne disease) ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของโครงสร้างที่ผิดปกติของโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบอยู่บนพื้นผิวของเซลล์ในสมอง ที่เรียกว่า prion อันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรมของ prion protein gene มีผลต่อการทำงานของสมองและระบบประสาท ส่วนกลาง โรควัวบ้าจัดอยู่ในกลุ่มของโรค Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้เกิดอาการทางสมอง และทำให้เซลล์สมองมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ โรคในกลุ่มนี้จะเกิดได้ในแพะ แกะ กวาง แมว และคน ซึ่งโรคที่เกิดในคน คือ โรค Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) (ลัมัย และนวนิยา, 2561) โดยโรควัวบ้าพบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษในเดือนเมษายน ปี ค.ศ. 1986 (Nesic *et al.*, 2014) และพบการแพร่ระบาดไปยังประเทศอื่นๆในทวีปยุโรป เช่น ไอร์แลนด์ สวิตเซอร์แลนด์ ฝรั่งเศส ลิกเตนสไตน์ ลักเซมเบิร์ก เนเธอร์แลนด์ โปรตุเกส และเดนมาร์ก นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบการระบาดในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา (WOAH, 2024) ทำให้สหภาพยุโรป (European Union) มีการห้ามใช้โปรตีนของเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการ (processed animal proteins, PAPs) รวมทั้งเนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal) เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ (European Commission, 2001, 2002, 2003; Olsvik *et al.*, 2017) สำหรับประเทศไทยนั้น ได้มีการกำหนด “ห้ามใช้เนื้อป่น เนื้อป่นสกัดไขมัน เนื้อและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนผสมในการผลิตสำหรับอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง” ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ.2558 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)

Feline spongiform encephalopathy (FSE) คือ โรคสมองเสื่อมในแมว เป็นโรคทางระบบประสาทที่เกิดจาก prion ซึ่งส่งผลกระทบต่อสัตว์ในตระกูลแมว อยู่ในกลุ่มของโรค Transmissible spongiform encephalopathy (TSEs) เช่นเดียวกับโรควัวบ้า เกิดจากการเรียงตัวโครงสร้างโปรตีนที่ผิดปกติของ prion ที่ชื่อว่า PrP^C เปลี่ยนเป็น PrP^{res} และเกิดการต้านทานต่อเอนไซม์ Proteinase K อีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับ PrP^C ซึ่งโรคนี้มีระยะฟักตัวนาน เมื่ออาการทางคลินิกปรากฏขึ้น จะส่งให้แมวที่ติดโรค FSE ตายในไม่ช้า (CFSPH, 2016) มีการรายงานการพบโรค FSE ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 และมีการตั้งข้อสังเกตว่าการระบาดของ FSE ในแมวนั้น อาจมาจากอาหารสัตว์เลี้ยงที่ปนเปื้อนโรควัวบ้า เมื่อการระบาดของโรควัวบ้าถูกควบคุม ทำให้การระบาดของโรค FSE พบได้น้อยลง (Londhe *et al.*, 2012) แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานยืนยันที่ชัดเจนของการเกิดโรค FSE นั้นมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับโรควัวบ้า อันเนื่องมาจากการใช้เนื้อวัวเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์เลี้ยง แต่จากการเปรียบเทียบ prion ของสัตว์ที่เป็นโรค FSE และโรควัวบ้า พบว่า prion นั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Eiden *et al.*, 2010) สำหรับประเทศไทยนั้นยังไม่พบข้อกำหนดใดๆ ระบุถึงการห้ามใช้เนื้อป่น เนื้อป่นสกัดไขมัน เนื้อและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนผสมในการผลิตสำหรับอาหารสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะอาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมว แต่ผู้นำเข้าอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในบางประเทศยังคงเรียกร้องรายงานผลการตรวจหาเนื้อและกระดูกป่นจากประเทศผู้ผลิตและส่งออก หรือสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง แม้ว่าประเทศไทยนั้นจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 กลุ่มประเทศที่ไม่พบการรายงาน

สถานการณ์ความเสี่ยงของโรควัวบ้าอย่างเป็นทางการ (ภาพที่ 1) ซึ่งปัญหาดังกล่าวอาจเป็นอุปสรรคต่อการส่งออกอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงของไทยในอนาคต



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงสถานการณ์ความเสี่ยงของโรควัวบ้าหรือ BSE โดย WOAH ณ เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2567 (WOAH, 2024)

วิธีการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ในประเทศไทยนั้น มีอยู่ 2 วิธี คือ การตรวจแยกด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) และวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR หรือ Real-time PCR (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์, 2567) ซึ่งวิธีการตรวจแยกด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) เป็นเทคนิคดั้งเดิมสำหรับตรวจหาการปลอมปนและบ่งบอกชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยจำแนกลักษณะเฉพาะตัว (typical characters) ของเนื้อและกระดูกปนภายใต้กล้อง stereomicroscope และกล้อง compound microscope สิ่งที่สำคัญของการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีนี้คือ ผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องมีความรู้และมีประสบการณ์ เกี่ยวกับรูปร่าง โครงสร้างของเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ และต้องทราบลักษณะเฉพาะตัวของวัตถุดิบแต่ละชนิดได้เป็นอย่างดี (แพรวพรรณ และดรุณี, 2544) แต่การตรวจหาการปลอมปนโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์นี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละสายพันธุ์ (species) ได้ เป็นปัญหาในการตรวจแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นวัตถุดิบต้องห้ามในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ปีก เช่น เนื้อสัตว์ปีกปน ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกและขนสัตว์ปีกปน ซึ่งไม่ใช่วัตถุดิบต้องห้ามสำหรับผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยลักษณะเฉพาะตัวของวัตถุดิบทั้ง 2 กลุ่มนี้ใกล้เคียงกัน (แพรวพรรณ และดรุณี, 2544) การตรวจหาการปลอมปนด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ แต่การตรวจหาเนื้อและกระดูกปนด้วยวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ด้วยเทคนิค PCR หรือ Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความไว และเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับสำหรับใช้หาการปนเปื้อน (Drummond *et al.*, 2013) โดยใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจในการตรวจแยกเป็นเทมเพลตเป้าหมาย

และใช้ primer ที่มีความเฉพาะเจาะจง (species-specific primers) จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและทำปฏิกิริยาทาง PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (Mafra *et al.*, 2007) ในขั้นตอน amplification (amplification cycles) ของการทำปฏิกิริยาทาง PCR สามารถตรวจหาดีเอ็นเอได้โดยใช้ fluorescent probes ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น (oligonucleotide) ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เรียกว่า Real-time PCR (Brooker, 2017)

Cheng *et al.* (2003) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอของเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องด้วยเทคนิค species-specific PCR เพื่อจำแนกดีเอ็นเอของโค สุกร แกะ และไก่ ด้วย primer ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไมโทคอนเดรีย และ Chisholm *et al.* (2005) ได้พัฒนาวิธีตรวจหาเนื้อม้าและลิงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ตามท้องตลาด ด้วยเทคนิค Real-time PCR ต่อมา Hsieh and Ofori (2014) พัฒนารูปแบบการปนเปื้อนของเนื้อม้าในผลิตภัณฑ์เนื้อดิบ และผลิตภัณฑ์เนื้อปรุงสุกด้วยวิธี competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) หลังจากนั้น Karabasanavar *et al.* (2023) ได้ทำการจำแนกเนื้อโคและกระป๋องด้วยเทคนิค Multiplex PCR ด้วย forward primer ที่จำเพาะเจาะจงกับโคและกระป๋องที่ไมโทคอนเดรีย บริเวณ D-loop region จำแนกชนิดโดยดูจากขนาด PCR product ที่ 382 และ 336 bp ตามลำดับ และ Marein *et al.* (2024) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีนที่แปรรูปจากไก่และไก่วงในอาหารสุกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจหาปริมาณโปรตีนที่แปรรูปจากไก่และไก่วงในอาหารสุกรได้ต่ำสุดที่ 0.1%

ในประเทศไทย จิรภา (2559) ได้พัฒนาและทวนสอบชุดทดสอบ Multiplex Direct PCR เพื่อการตรวจระบุชนิดของสัตว์ที่นิยมบริโภคในภูมิภาคเอเชียจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข เป็ด แพะ กระบือ และแกะ ที่จำเพาะเจาะจงกับ cytochrome oxidase subunit 1 พบว่ามี PCR product ขนาด 230 283 363 396 และ 477 bp สำหรับสุนัข เป็ด แพะ กระบือ และแกะ ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างอาหารประเภทต่าง ๆ ในท้องตลาดจำนวน 62 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบเนื้อสัตว์เป้าหมายในอาหารได้สูงถึงร้อยละ 83.9 แม้ว่าอาหารจะผ่านกระบวนการปรุงสุกด้วยความร้อนมาแล้ว

เพื่อเป็นการป้องกัน ติดตาม และตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงเพื่อการส่งออก และป้องกันโรค BSE งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของโค (*Bos taurus*) ม้า (*Equus caballus*) และสุกร (*Sus scrofa*) ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR และพัฒนาการใช้ internal control ในวิธีทดสอบ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 LightCycler® 480 II Real-time PCR (Roche, Germany)
- 1.2 Nanodrop BioSpectrometer Basic (Eppendorf, Germany)
- 1.3 Balance (Metler Toledo, Switzerland)
- 1.4 Centrifuge (Eppendorf, Germany)

- 1.5 PCR-Cabinet (Gelman, Singapore)
- 1.6 Heating block (Miulab, China)
- 1.7 Piston pipette ขนาด 1-10, 10-100, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

2. สารเคมี

- 2.1 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany)
- 2.2 Probe and primers specific to 18S rRNA (Biolegio, The Netherlands)
- 2.3 Probe and primers specific to Bovine (Biolegio, The Netherlands)
- 2.4 Probe and primers specific to Horse (Biolegio, The Netherlands)
- 2.5 Probe and primers specific to Pork (Biolegio, The Netherlands)
- 2.6 Isopropanol, molecular grade (Sigma Aldrich, Germany)
- 2.7 Distilled water, PCR grade (Apsalagen, Thailand)
- 2.8 LightCycler®480 Probes master (Roche, Germany)

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

3.1 การเตรียมตัวอย่างตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำมาตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่ส่งมาวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ณ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR แล้วว่าไม่พบดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง จำแนกได้ ดังนี้

- 3.1.1 ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับแมว) จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.1.2 ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับสุนัข) จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.1.3 ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงแบบแห้ง (สำหรับแมว) จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.1.4 ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงแบบแห้ง (สำหรับสุนัข) จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.1.5 ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.1.6 ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.2 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น (Pre - Limit of Detection, Pre-LOD) ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

นำเนื้อโค ม้า และสุกรที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผง ใส่ลงในตัวอย่างที่ 1-3 ของอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงแต่ละชนิดในข้อ 3.1.1-3.1.6 ให้มีระดับการปนเปื้อนเนื้อโค ม้า และสุกร ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 1%, 0.1% และ 0.01% w/w ตามลำดับ จำนวน 18 ตัวอย่างต่อ 1 ระดับความเข้มข้น จำนวนทั้งสิ้น 72 ตัวอย่าง

3.3 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

นำเนื้อโค ม้า และสุกรที่ผ่านการแห้งและบดเป็นผง ใส่ลงในตัวอย่างที่ 4-8 ของอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1.1-3.1.6 ให้ได้ระดับการปนเปื้อนต่ำสุดซึ่งได้จากผลการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น (ข้อที่ 3.2) จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาชั่งน้ำหนักเพื่อสกัดดีเอ็นเอจำนวนตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ได้จำนวนตัวอย่าง 60 ตัวอย่าง

3.4 การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบหาความจำเพาะ

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงปนเปื้อนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ชนิดอื่น

แบ่งตัวอย่างที่ 9 ของอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1.1-3.1.6 ออกเป็นสามส่วนเท่า ๆ กัน แต่ละส่วนผสมเนื้อแกะ แพะ หรือกระป๋องอบแห้งที่ระดับการปนเปื้อนเดียวกับข้อ 3.3 รวม 18 ตัวอย่าง

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค อาหารสัตว์เลี้ยงและวัตถุดิบอาหารสัตว์ เพื่อใช้เป็น blank sample

ใช้ตัวอย่างที่ 10 ของอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค อาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1.1-3.1.6 และวัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ข้าวโพด รำสกัดน้ำมัน ขนสัตว์ปีกปน และรำข้าวสาลี ชนิดละ 1 ตัวอย่าง รวม 11 ตัวอย่าง

3.5 การเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

3.5.1 Positive control

ควบคุมผลการทดสอบด้วย positive control โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อโค เนื้อม้า และเนื้อสุกร ซึ่งต้องพบค่า C_t ในทุกรอบของการทดสอบ

3.5.2 Negative control

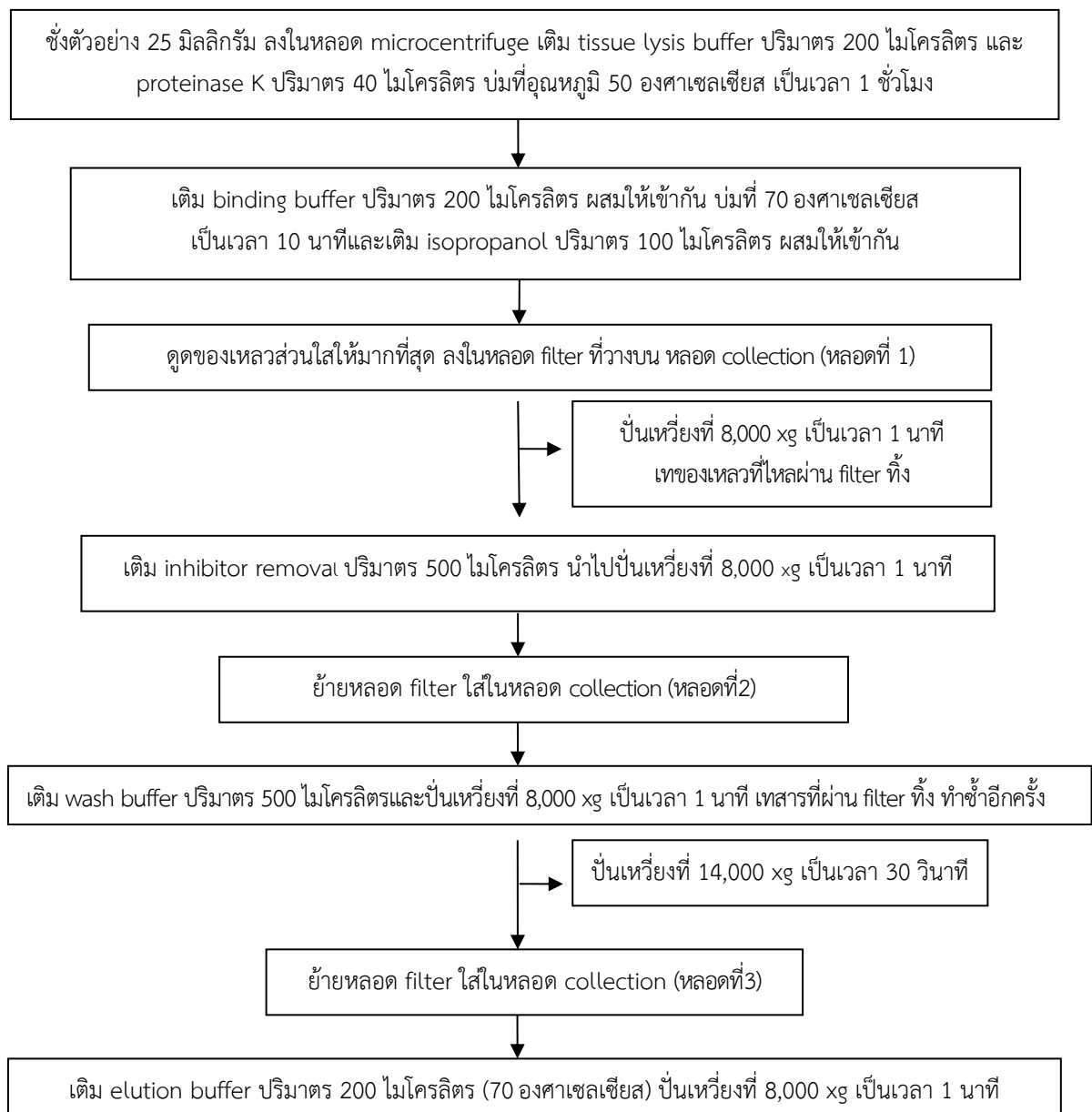
ควบคุมผลการทดสอบด้วย negative control โดยใช้ distilled water, PCR grade ทดแทนการใช้ดีเอ็นเอเป็นเป้าหมาย (no DNA template) ซึ่งต้องไม่พบค่า C_t ในทุกรอบของการทดสอบ

3.5.3 Internal control

ควบคุมผลการทดสอบด้วย internal control โดยใช้ primer และ probe ที่ออกแบบไว้ และมีจำเพาะต่อ 18S rRNA gene ทั้งพืชและสัตว์ โดยในทุกรอบของการทดสอบต้องพบค่า C_t ในทุกตัวอย่างทดสอบและพบค่า C_t ใน reaction ของ positive control แต่ไม่พบค่า C_t ใน reaction ของ negative control

4. วิธีการทดลอง

4.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ดำเนินตามวิธีการที่กำหนดในคู่มือแยกสกัดดีเอ็นเอ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 2023) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ High Pure PCR Template Preparation Kit

4.2 การตั้งค่าสถานะที่ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

นำดีเอ็นเอของโค ม้า สุกกร ที่สกัดได้จากขั้นตอนในข้อที่ 4.1 มาทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 II โดยกำหนดค่าอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการวิเคราะห์ โดยอ้างอิงจาก (ISO/TS 20224-1:2020; ISO/TS 20224-3:2020; ISO/TS 20224-6:2020) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การตั้งค่าสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

Programs	Temperature (°C)	Hold (hh:mm:ss)
Pre-incubation	95	00:10:00
Amplification (Analysis mode: Quantification) (45 cycles)	95 60	00:00:15 00:01:00
Cooling (Analysis mode: None)	40	00:00:30

4.3 การออกแบบชุด primer และ probe สำหรับใช้เป็น internal control

ออกแบบชุด primer และ probe จำนวน 1 ชุด ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอพืชและสัตว์ที่บริเวณ conserved sequence ของ 18S rRNA gene จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อใช้เป็น internal control ด้วยโปรแกรม qPCR Primer & Probe Design Tool (<https://eurofinsgenomics.eu>) โดยกำหนดให้ PCR product หรือ amplicon size มีขนาด 80-200 bp ให้ primer และ probe มีความยาวขนาด 15-30 bp มี GC content อยู่ในช่วง 30-80% ไม่มี secondary structure (Rodriguez *et al*, 2015)

4.4 ขั้นตอนการตรวจสอบ internal control ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับ โคและอาหารสัตว์เลี้ยง

นำ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene ที่ออกแบบในข้อที่ 4.3 มาใช้เป็น internal control ในทุกช่วงการทดสอบ โดยทำการเตรียมน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อใช้ตรวจจำแนกดีเอ็นเอ 18S rRNA gene (internal control) ให้มีปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ reaction ดัง**ตารางที่ 2** จากนั้นทำการทดสอบปฏิกิริยา โดยใช้สถานะเดียวกับการตั้งค่าสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ในข้อที่ 4.2

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำยาทดสอบ เพื่อตรวจหา 18S rRNA gene (internal control)

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)/reaction
Probes master (2X)	12.5
18S rRNA Forward primer (10 µMol/L)	1.0
18S rRNA Reverse primer (10 µMol/L)	1.0
18S rRNA TaqMan probe (10 µMol/L)	0.5
Distilled water, PCR grade	5.0
Total volume	20

4.5 การติดฉลากสี probe ของโค ม้า และสุกร เพื่อทำ Multiplex probe

งานวิจัยครั้งนี้ใช้ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ *Bos taurus* beta actin gene ในโครโมโซมคู่ที่ 25 ของโค อ้างอิงจาก ISO/TS 20224-1: 2020 primer และ probe ที่จำเพาะต่อ twilight breed thoroughbred gene ในโครโมโซมคู่ที่ 28 ของม้า อ้างอิงจาก ISO/TS 20224-6: 2020 และ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ *Sus scrofa* beta actin (ACTB) gene ของสุกร อ้างอิงจาก ISO/TS 20224-3: 2020 และนำ probe สำหรับตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ซึ่งติดฉลากสี fluorescent dye เป็นสี FAM ชนิดเดียวกัน มาทำการเปลี่ยนฉลากสี fluorescent dye ที่ยึดเกาะกับ probe ของโค ม้า และสุกร ที่ตำแหน่ง 5' region เป็นสี FAM, HEX และ CY5 ตามลำดับ เพื่อใช้เป็น Multiplex probe สำหรับการตรวจหาด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

4.6 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR สำหรับตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร

เตรียมน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR เพื่อใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรต่อ reaction ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาตรของน้ำยาทดสอบ เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)/ reaction
Probes master (2X)	12.5
Bovine Forward primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Bovine Reverse primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Bovine probe (12.5 μ Mol/L)	0.4
Horse Forward primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Horse Reverse primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Horse probe (12.5 μ Mol/L)	0.4
Porcine Forward primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Porcine Reverse primer (12.5 μ Mol/L)	0.8
Porcine probe (12.5 μ Mol/L)	0.4
Distilled water, PCR grade	1.5
Total volume	20

4.7 ขั้นตอนการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น (Pre-Limit of Detection; Pre-LOD) ของการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่มีระดับการปนเปื้อนดีเอ็นเอโค ม้า และสุกรอยู่ที่ 10%, 1%, 0.1%, และ 0.01% w/w ตามลำดับ ในข้อที่ 3.2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้นด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

4.8 ขั้นตอนการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่ปนเปื้อนเนื้อโค ม้า และสุกร ที่ระดับต่ำสุดในข้อที่ 3.3 จำนวน 60 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 จากนั้นนำมาตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR และหาค่า cut-off ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร

4.9 ขั้นตอนการตรวจสอบหาความจำเพาะ

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่ปนเปื้อนเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในข้อที่ 3.4.1 และตัวอย่าง blank sample ในข้อที่ 3.4.2 รวมจำนวน 29 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 และนำมาตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

4.10 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี หาได้จากการคำนวณผลตรวจสอบของขั้นตอนในข้อที่ 4.6-4.7 โดยคำนวณหาค่า ความไวของวิธีทดสอบ (Sensitivity) ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (Specificity) และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (Efficiency) (Eurachem, 2021)

4.10.1 ความไวของวิธีทดสอบ

หาค่าความไวของวิธีทดสอบ หรือ อัตราผลบวกจริง (true positive rate) ใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ในข้อที่ 4.8 โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{Sensitivity, SS (True Positive Rate, TP)} = [tp / (tp + fn)] \times 100\%$$

เมื่อ

tp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง

fn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม

4.10.2 ความจำเพาะของวิธีทดสอบ

หาค่าความจำเพาะของวิธีทดสอบ หรือ อัตราผลลบจริง (true negative rate) ใช้ผลการตรวจสอบที่ได้จากขั้นตอนการตรวจสอบหาความจำเพาะในข้อที่ 4.9 โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{Specificity, SP (True Negative Rate, TN)} = [tn / (tn + fp)] \times 100\%$$

เมื่อ

tn คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง

fp คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม

4.10.3 ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ

การหาค่าประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ ใช้ผลการตรวจสอบที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.8 – 4.9 มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{Efficiency (E)} = [(tp + tn) / (p + n)] \times 100\%$$

เมื่อ

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

4.11 การตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างอื่น ๆ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

4.11.1 นำตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญรายการ meat authenticity จากหน่วยงาน FAPAS จำนวน 1 ตัวอย่าง รหัส 29117 (ตรวจหาดีเอ็นเอของเนื้อม้าและสุกรในตัวอย่างเนื้อโคผง) มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 และนำไปตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

4.11.2 การตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ภายใต้กิจกรรมตรวจรับรองคุณภาพอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ณ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในระหว่างปีงบประมาณ 2566 – 2567 จำนวนทั้งสิ้น 120 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค จำนวน 70 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง จำนวน 50 ตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 และนำไปตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การออกแบบชุด primer และ probe สำหรับใช้เป็น internal control

จากการออกแบบชุด primer และ probe ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอพืชและสัตว์ที่บริเวณ conserved region เพื่อใช้เป็น internal control จำนวน 1 ชุด โดยติดฉลากด้าน 5' region ด้วยสี FAM และด้าน 3' region ด้วย BHQ1 quencher ทำให้ได้ชุด primer และ probe ที่มีความจำเพาะและมี GC content อยู่ในช่วง 30-80% (Rodriguez *et al*, 2015) ดังตารางที่ 4

ซึ่ง 18S rRNA gene เป็นสายพันธุกรรมสำหรับสังเคราะห์โปรตีนหน่วยย่อย (sub unit protein) ของไรโบโซม พบได้ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอตของพืชและสัตว์ สายพันธุกรรมของ 18S rRNA gene มีบริเวณสายพันธุกรรมที่อนุรักษ์ไว้สูง (conserved region) ส่วนบริเวณสายพันธุกรรมของ 18S rRNA gene ที่แปรผัน (non- conserved region) นิยมนำมาจำแนกสายพันธุ์ หรือศึกษาวิวัฒนาการของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Xia *et al*. 2011) ดังนั้นการออกแบบ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene บริเวณ conserved region สามารถนำมาใช้เป็น internal control ได้ เนื่องจากส่วนประกอบในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคประกอบไปด้วยพืช และส่วนประกอบหลักของอาหารสัตว์เลี้ยงเป็นเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4 primer และ probe ของ 18S rRNA gene (internal control)

Target	Primer/Probe	Sequence (5'→ 3')	GC content
Internal control (18S rRNA gene)	Forward primer	GTTCTGACCGTAACTATGCC	47.6
	Reverse primer	CACCACCAACCACCAAATC	52.6
	Probe	(FAM)-TGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACT CAACAC-(BHQ1)	50.0

2. การติดฉลากสี probe ของโค ม้า และสุกร เพื่อทำ Multiplex probe

ลำดับ sequence ของ primer และ probe ที่จำเพาะต่อโค ม้าและสุกรที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ อ้างอิงจาก ISO/TS 20224:2020 series ทำการติดฉลากสี probe ที่ด้าน 5' region โดยให้ probe สำหรับโคติดฉลากสี FAM ส่วน probe สำหรับม้าติดฉลากสี HEX และ probe สำหรับสุกรติดฉลากสี CY5 เพื่อทำเป็น multiplex probe และใช้แยกความแตกต่างของ PCR product ได้ ดังตารางที่ 5 โดยมีค่า excitation และค่า emission ของสี FAM เท่ากับ 465 nm และ 510 nm สี HEX เท่ากับ 533 nm และ 580 nm สี CY5 เท่ากับ 618 nm และ 660 nm ตามลำดับ (Roche, 2024) จากค่า emission signal ของ fluorescent dye ที่ความยาวคลื่นแสงแตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของ PCR product ได้ (Lee *et al.*, 2013)

ตารางที่ 5 primer และ probe ของโค ม้า และสุกร

Target	Primer/Probe	Sequence (5'→ 3')	Reference
Bovine (Beta actin gene)	Forward primer	GGCCTCGGAGTGTGTATTCAG	ISO/TS 20224-1: 2020
	Reverse primer	GCCCCAGAATGAGGTTCACTT	
	Probe	(FAM)-AGGTGCACAGTACGTTC-(MGB)	
Horse (Twilight breed thoroughbred chromosome 28 gene)	Forward primer	ACTCATCAAACGCCGCTCTC	ISO/TS 20224-6: 2020
	Reverse primer	GCTGTGAAGACCCCGTTGG	
	Probe	(HEX)-CCAGGGCTCGGTGCTTCCA ATCGC-(TAMRA)	

ตารางที่ 5 primer และ probe ของโค ม้า และสุกร (ต่อ)

Target	Primer/Probe	Sequence (5'→ 3')	Reference
Porcine (Beta actin (ACTB) gene)	Forward primer	CGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAC	ISO/TS 20224-3: 2020
	Reverse primer	GGCCAGACTGGGGACATG	
	Probe	(CY5)-CCAGGTCGGGGAGTC-(MGB)	

3. การตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

การหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น ที่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 1%, 0.1% และ 0.01% w/w ตามลำดับ ทำการแปลผลโดยดูจากปริมาณความเข้มข้นต่ำที่สุด ที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในทุกตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน ผลการตรวจสอบพบว่าการหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดระดับเดียวกันคือ 0.1% w/w ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น

ระดับของการปนเปื้อน	ตัวอย่างทดสอบ	Internal control	วิธี Multiplex Real-time PCR		
			โค (n = 3)	ม้า (n = 3)	สุกร (n = 3)
10% โค + 10% ม้า + 10% สุกร	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบแห้ง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบเปียก	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบแห้ง	พบ	พบ	พบ	พบ
1% โค + 1% ม้า + 1% สุกร	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบเปียก	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบแห้ง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบเปียก	พบ	พบ	พบ	พบ
0.1% โค + 0.1% ม้า + 0.1% สุกร	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบแห้ง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบเปียก	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด	พบ	พบ	พบ	พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบแห้ง	พบ	พบ	พบ	พบ

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้น (ต่อ)

ระดับของ การปนเปื้อน	ตัวอย่างทดสอบ	Internal control	วิธี Multiplex Real-time PCR		
			โค (n = 3)	ม้า (n = 3)	สุกร (n = 3)
0.01% โค +	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
0.01% ม้า +	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบแห้ง	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบเปียก	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
0.01% สุกร	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบแห้ง	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบเปียก	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	Positive control	พบ	พบ	พบ	พบ
	Negative control	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

4. การตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง

การตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่ 0.1% w/w ซึ่งได้จากการตรวจสอบหาปริมาณต่ำสุดของวิธีเบื้องต้นในข้อที่ 3 ทำการแปลผลโดยดูจากค่า C_t หรือ threshold cycle ซึ่งทุกตัวอย่างต้องพบค่า C_t ไม่เกิน 40 cycles ของสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาจำนวน 45 cycles โดยโปรแกรมการทำงานของเครื่อง LightCycler® 480 II ที่ใช้ในการทดสอบ จะไม่คำนวณค่า C_t ใน 5 cycles สุดท้ายของจำนวน cycles ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจาก ค่า C_t ที่ได้มีค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) สูงกว่าค่าความไม่แน่นอนของค่า C_t ใน cycles อื่นๆ (Roche, 2008) และดูค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแต่ละชนิดตัวอย่างไม่เกิน 5% หากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้มีค่ามากกว่า 5% แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบนั้นไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการหาค่า cut-off ของการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร โดยดูจากค่า C_t สูงสุดของทุกชนิดตัวอย่าง เพื่อประมาณการค่า cut-off หรือค่า C_t สูงสุดที่เป็นไปได้ในการตรวจพบดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% w/w

จากผลการตรวจสอบพบว่า สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงทั้ง 60 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดเดียวกันที่ 0.1% w/w โดยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแต่ละชนิดตัวอย่างมีค่าไม่เกิน 5% ตรวจพบค่า C_t ของ positive control และ internal control ในทุกรอบการทดสอบ และไม่พบค่า C_t ของ negative control ในทุกรอบการทดสอบ สำหรับค่า C_t ของ internal control อยู่ในช่วง 19.21 – 21.13 โดยค่า C_t ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่างที่สกัดและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอหาได้จากอัตราส่วน A260/A280 ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 (Lucena-Aguilar *et al.* 2016) ดังนั้น primer และ probe สำหรับ internal control ที่ออกแบบไว้ในข้อที่ 4.1 สามารถใช้ควบคุมคุณภาพผลการทดสอบได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pegels *et al.* (2012) ซึ่งได้ออกแบบ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene ในเซลล์ยูคาริโอตบริเวณ conserved region มา

ใช้เป็น positive amplification control ในการพัฒนาวิธีตรวจจำแนกชิ้นส่วนสัตว์ปีกและขนสัตว์ปีกปนของไก่ ไก่วง เป็ด และห่านในตัวอย่างอาหารสัตว์ พบว่าสามารถนำมาใช้เป็น positive amplification control ในการควบคุมผลการทดสอบได้ แม้ว่าไม่ทราบส่วนประกอบของตัวอย่างทดสอบ เนื่องจาก 18S rRNA gene ในเซลล์ยูคาริโอตนี้พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ดังตารางที่ 7

ค่า C_t สูงสุดของโค ม้า และสุกรในทุกชนิดตัวอย่างอยู่ที่ 37.28, 36.81 และ 36.83 ตามลำดับ ดังนั้นค่า cut-off ในการรายงานผลทดสอบว่า “พบ” สำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ต้องมีค่า C_t น้อยกว่าหรือเท่ากับ 38, 37 และ 37 ตามลำดับ ภายใน 45 cycles เนื่องจากค่า C_t ในตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอาจมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ระยะเวลาการเก็บรักษาดีเอ็นเอ ปริมาณ inhibitor ในตัวอย่างทดสอบ เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่งผลต่อค่า C_t ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบการทดสอบ ดังนั้นการประมาณค่า cut-off เพื่อการรายงานผลการทดสอบ จึงหาได้จากการประมาณค่า C_t มากสุดที่มีโอกาสเป็นไปได้จากตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดหลาย ๆ ซ้ำรวมกัน ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.1 % w/w

ตัวอย่างทดสอบ	ผลตรวจสอบ Limit of Detection (LOD) ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR							
	Internal control		โค		ม้า		สุกร	
	Max C_t	SD	Max C_t	SD	Max C_t	SD	Max C_t	SD
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบผง (n = 10)	20.39	0.15	36.69	0.36	36.27	0.54	36.09	0.27
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคแบบเม็ด (n = 10)	20.05	0.30	36.00	0.36	36.02	0.35	35.86	0.17
อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบเม็ด (n = 10)	20.73	0.38	36.7	0.49	35.69	0.18	35.97	0.27
อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับแมวแบบเปียก (n = 10)	20.40	0.19	37.28	0.50	36.23	0.45	36.21	0.46
อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบเม็ด (n = 10)	20.98	0.51	36.08	0.40	36.81	0.35	35.88	0.23
อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขแบบเปียก (n = 10)	21.13	0.16	36.87	0.41	36.66	0.43	36.83	0.52
Positive control (เนื้อโค ม้า และสุกร)	20.93	0.52	24.95	0.33	24.99	0.28	27.84	0.32
Negative control (no template)	ไม่พบ	-	ไม่พบ	-	ไม่พบ	-	ไม่พบ	-
Total (n = 60)	20.83	0.23	37.28	0.44	36.81	0.40	36.83	0.34

5. การตรวจสอบหาความจำเพาะ

จากผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex Real-time PCR กับอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอของแกะ แพะ และกระบือ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% w/w และ blank sample รวมจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบความจำเพาะไม่พบค่า C_t ให้ผลการตรวจสอบดังตารางที่ 8 แสดงว่าวิธี Multiplex Real-time PCR นี้มีความจำเพาะต่อโค ม้า และสุกร ไม่พบ cross-reactivity กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของแกะ แพะ และกระบือ และ blank sample

ตารางที่ 8 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex Real-time PCR

ตัวอย่างทดสอบ	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex Real-time PCR			
	โค	ม้า	สุกร	Internal control
วัตถุดิบ ได้แก่ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ข้าวโพด รำสกัดน้ำมัน ขนสัตว์ปีกปน และรำข้าวสาลี (n = 5)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ
อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคและอาหาร สัตว์เลี้ยงที่ปราศจากเนื้อโค ม้า และสุกร (n = 6)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ
อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับโคและอาหาร สัตว์เลี้ยงที่ปนเปื้อนเนื้อแพะ แกะ และ กระบือ 0.1% w/w (n = 18)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ
Positive control (เนื้อโค ม้า และสุกร)	พบ	พบ	พบ	พบ
Negative control (no template)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

6. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

จากผลตรวจสอบในข้อที่ 4 – 5 ตรวจพบดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรที่ระดับ 0.1% w/w ทั้ง 60 ตัวอย่างได้จริง ($tp = 60$) และไม่พบผลลบปลอม ($fn = 0$) ไม่พบการ cross-reactivity ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ และ blank sample ($tn = 29$) และไม่พบผลบวกปลอม ($fp = 0$) ดังนั้นความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ สำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร มีค่าเท่ากันอยู่ที่ 100% ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี Multiplex Real-time PCR (โค ม้า และสุกร)

	จำนวนผลการทดสอบที่ตรวจพบ		
	โค	ม้า	สุกร
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง (<i>tp</i>)	60	60	60
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม (<i>fp</i>)	0	0	0
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด (<i>tp + fp</i>)	60	60	60
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง (<i>tn</i>)	29	29	29
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม (<i>fn</i>)	0	0	0
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมด (<i>tn + fn</i>)	29	29	29
ความไว (Sensitivity) $[tp / (tp + fn)] \times 100\%$	100 %	100 %	100 %
ความจำเพาะ (Specificity) $[tn / (tn + fp)] \times 100\%$	100 %	100 %	100 %
ประสิทธิภาพ (Efficiency) $[(tp + tn) / (p + n)] \times 100\%$	100 %	100 %	100 %

ดังนั้นวิธี Multiplex Real-time PCR นี้สามารถใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ โค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงได้ โดยสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจเหลือเพียง 1,250 บาท เมื่อเทียบกับวิธี Singleplex Real-time PCR ซึ่งมีค่าใช้จ่ายอยู่ที่ 2,700 บาท

7. การทดสอบตัวอย่างสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

7.1 การตรวจตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

ดำเนินการทดสอบตัวอย่างเนื้อสัตว์สำหรับทดสอบความชำนาญรายการ Meat authenticity จากหน่วยงาน FAPAS ประเทศอังกฤษ จำนวน 1 ตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง 29117 ซึ่งเป็นการตรวจหาเนื้อม้า และเนื้อสุกรในตัวอย่างเนื้อโคผง ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR จากผลการตรวจหาชนิดเนื้อในตัวอย่างทดสอบความชำนาญรายการนั้น ไม่พบการปนเปื้อนของเนื้อม้าและเนื้อสุกรในตัวอย่างเนื้อโคผง สอดคล้องกับรายงานสรุปผลการทดสอบของหน่วยงาน FAPAS ผลทดสอบเป็นที่น่าพอใจ (satisfactory) ดังตารางที่ 10 ดังนั้นการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกร ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ดังกล่าวนี้นี้มีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 10 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างทดสอบความชำนาญ รหัส 29117 จากหน่วยงาน FAPAS

ชนิดเนื้อสัตว์	ผลการตรวจหาดีเอ็นเอ		สรุปผล
	ผลการทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR	FAPAS	
เนื้อโค	พบ	เนื้อโค	-
เนื้อม้า	ไม่พบ	ไม่พบ	Satisfactory
เนื้อสุกร	ไม่พบ	ไม่พบ	Satisfactory
positive control	พบ	พบ	-
negative control	ไม่พบ	ไม่พบ	-

7.2 การตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

จากการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค และตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง ภายใต้กิจกรรมตรวจรับรองคุณภาพอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติ ควบคุมอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ณ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้า ปศุสัตว์ ในปีงบประมาณ 2566-2567 สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของโคจำนวน 15 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 120 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.50% แบ่งเป็นจำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโคจำนวน 70 ตัวอย่าง และตรวจพบจำนวน 4 ตัวอย่าง ในอาหารสัตว์เลี้ยงจำนวน 50 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 11 ตัวอย่างที่ตรวจพบในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR นั้น ไม่เป็นไปตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ประกาศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบ พ.ศ. 2558 ว่าด้วยการ “ห้ามใช้เนื้อปน เนื้อปนสกัดไขมัน เนื้อและกระดูกปนของสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนผสมในการผลิตสำหรับอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง” (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการตั้งใจปลอมปนเนื้อและกระดูกปนลงในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโคเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้น (Johnson *et al.* 2011) หรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนข้าม ในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ ที่ดำเนินการผลิตอาหารสัตว์หลากหลายชนิด ซึ่งการทำความสะอาดอุปกรณ์ ต่างๆในกระบวนการผลิตโดยวิธีการ flushing ในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ อาจยังไม่ดีพอทำให้เกิดการ ปนเปื้อนดีเอ็นเอของเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคได้ ส่วนการตรวจพบดีเอ็น เอของโคในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงคิดเป็น 0.08% แบ่งเป็นจำนวน 4 ตัวอย่างที่ตรวจพบในอาหารสัตว์ เลี้ยงจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวเป็นอาหารสัตว์เลี้ยงสำเร็จรูปสำหรับสุนัข รสเนื้อ ที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด และไม่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอเนื้อและกระดูกปนของโค ม้า และสุกร ในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงสำเร็จรูปสำหรับแมวที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบดีเอ็นเอของม้า

และสุกรในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง ทั้งสิ้น 120 ตัวอย่าง คิดเป็น 0% ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	Internal control	Multiplex Real-time PCR		
			โค (พบ/ตรวจ)	ม้า (พบ/ตรวจ)	สุกร (พบ/ตรวจ)
อาหารสัตว์ สำเร็จรูปสำหรับโค	70	100% (70/70)	15.71% (11/70)	0% (0/70)	0% (0/70)
อาหารสัตว์เลี้ยง	50	100% (50/50)	0.08% (4/50)	0% (0/50)	0% (0/50)
รวม	120	100% (120/120)	12.50% (15/120)	0% (0/120)	0% (0/120)
positive control	3	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)
negative control	3	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)

สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR พบว่าการตรวจหาโค ม้า และสุกรมีระดับปริมาณต่ำสุดเท่ากันอยู่ที่ระดับ 0.1% w/w มีค่า cut-off สำหรับการตรวจหาโค ม้า และสุกร เท่ากับ 38, 37 และ 37 ตามลำดับ วิธี Multiplex Real-time PCR นี้มีความจำเพาะ ไม่พบการ cross-reactivity กับวัตถุดิบอาหารสัตว์ และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของแกะ แพะ กระบือ ผลตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าทั้งโค ม้า และสุกรมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าประสิทธิภาพ เท่ากันอยู่ที่ 100% ผลการออกแบบ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA gene ในพืชและสัตว์ พบว่า สามารถใช้เป็น internal control ได้ โดยมีค่า C_t อยู่ในช่วง 19.21 – 21.13 เมื่อนำตัวอย่างทดสอบความชำนาญมาทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นวิธี Multiplex Real-time PCR นี้เหมาะสำหรับนำมาใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของโค ม้า และสุกรในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคและอาหารสัตว์เลี้ยง และช่วยลดต้นทุนในการตรวจให้เหลือเพียง 1,250 บาท

ข้อเสนอแนะ

ควรนำวิธีการเตรียมตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มาพัฒนาการเตรียมวัสดุอ้างอิงในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของเนื้อและกระดูกปนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลากหลายชนิด เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพการตรวจหาดีเอ็นเอของเนื้อและกระดูกปนด้วย

Real-time PCR ตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจนถึงการทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หมวด 8 การควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 4 ธันวาคม 2558. ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 132 ตอนพิเศษ 322ง, น. 11-12.
- จิรภา เดชนครินทร์. 2559. การประยุกต์ใช้เทคนิคัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดเนื้อสัตว์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. จ.สงขลา. 123 หน้า.
- แพรวพรรณ ห้องทองแดง และตรุณี กอเขา. 2544. ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีนที่มาจากสัตว์, น. 243-249. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 (สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์) 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ลัมย์ นามมงคล และนวิยา รักษ์ภาพ. 2561. การประเมินความเสี่ยงเชิงคุณภาพของการนำเข้าโรควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy (BSE)) ในเนื้อและเครื่องในจากโคที่นำเข้าจากประเทศเบลเยียม. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 20 หน้า.
- สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. ข้อสัญญาและขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ. แหล่งที่มา: <https://qcontrol.dld.go.th/images/stories/service/limitationlab1.pdf> [8 ตุลาคม 2567]
- Brooker, R. 2017. Genetics: Analysis and principles. 6th eds. McGraw-Hill Education. The United State of America. 25 pages.
- CFSPH. 2016. Feline spongiform encephalopathy. [Online]. Available: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/feline_spongiform_encephalopathy.pdf. Accessed September 2, 2024.
- Cheng, Y.H., Wen, C.M., Ding, S.T., Kao, C.C. and Kuo, T.Y. 2003. Detecting meat-and-bone meal in ruminant's feeds by species-specific PCR. *J. Animal and Feed Sciences*. 12: 851-860.
- Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W. and Hird, H. 2005. The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*. 70(4): 727-732.

- Drummond, M.G., Brasil, B.S.A.F., Dalsecco, L.S., Brasil, R.S.A.F., Teixeira L.V. and Oliveira, D.A.A. 2013. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Cont.* 29: 131-137.
- Eiden, M., Hoffmann, C., Buschmann, A.B., Muller, M., Baumgartner K. and Groschup, M.H. 2010. Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a german captive cheetah. *Journal of General Virology.* 91: 2874-2883.
- Eurachem, 2021. Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. Pp. 7-9. Silva, R. B. and Ellison, S. L. R. ed. Eurachem/CITAC guide.
- European Commission. 2001. Commission Regulation (EC) No 999/2001 laying down rules for the prevention, control, and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Commun.* L147 22/05/2001. 1-40.
- European Commission. 2002. Commission Regulation (EC) No 1774/2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Off. J. Eur. Commun.* L273 03/10/2002. 1-95.
- European Commission. 2003. Commission Regulation (EC) No 1234/2003 Amending Annexes I, IV and XI to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and the Council and Regulation (EC) No 1326/2001 as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. *Off. J. Eur. Commun.* L173/6 10/07/2003. 1-8.
- Hsieh, Y.P. and Ofori J.A. 2014. Detection of horse meat contamination in raw and heat-processed meat products. *J. Agric. Food Chem.* 62(52): 12536-12544.
- ISO/TS 20224-1: 2020. Molecular biomarker analysis — Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 2: Bovine DNA detection method. 1st edition. The International Organization for Standardization. Switzerland. 22 pp.
- ISO/TS 20224-3: 2020. Molecular biomarker analysis — Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 3: Porcine DNA detection method. 1st edition. The International Organization for Standardization. Switzerland. 24 pp.
- 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. 1st edition. The International Organization for Standardization. Switzerland. 22 pp.

- Johnson, C.J., McKenzie, D., Pedersen, J.A. and Aiken, J.M. 2011. Meat and Bone Meal and Mineral Feed Additives May Increase the Risk of Oral Prion Disease Transmission. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*(74): 161–166.
- Karabasanavar, N.S., Shivanagowda, G.P. and Singh, S.P. 2023. Differentiation of cattle and buffalo meat using multiplex polymerase chain reaction. *Buffalo Bulletin*. 42(1): 57-66.
- Lee, M.A., Squirrel, D.L., Lesile D.L. and Brown, T. 2013. Homogenous fluorescent chemistries for real-time PCR, pp. 1-36. Saunder, N. A. and Lee, M. A. ed. Real-time PCR advanced Technologies and applications. Caister Academic Press. Norflox, United Kingdom.
- Londhe, M.S., Mahajan, N.K., Gupta, R.P. and Londhe, R.M. 2012. Review on prion diseases in animals with emphasis to Bovine Spongiform Encephalopathy. *Vet. World*. 5(7): 443-338.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A.M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J.A., López-Guerrero, J.A. and Aguilar-Quesada, R. 2016. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv Biobank*. 14(4): 264-270.
- Mafrá, I., Ferreira, I. and Oliveira, B. 2007. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Res. Tech.* 227(3): 649-665.
- Marien, A., Fumière, O., Roetschi, A., Maljean, J. and Berben, G. 2024. A validated real-time PCR test for simultaneous detection of Gallus gallus and Meleagris gallopavo in feed instead of an impossible poultry test. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 28(1): 1-16.
- Nesic, N., Samanc, H., Vujanac, I., Prodanovic, R., Nesic, V., Velebit B. and Savic., B. 2014. Detection of meat and bone meal in cattle feed and ruminant fluid-comparison and combining of microscopy and polymerase chain reaction. *Animal Feed Sci. Tech.* 187: 86-90.
- Olsvik, P.A., Fumière, O., Margry, R.J.C.F., Berben, G., Larsen, N., Alm, M. and Berntssen, M.H.G. 2017. Multi-laboratory evaluation of a PCR method for detection of ruminant DNA in commercial processed animal proteins. *Food Control*. 73. Part B: 140-146.
- Pegels, N., González, I., López-Calleja, L., Fernández, S., García, T. and Martín, R. 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: 1709-1791.

- Roche. 2008. LightCycler® 480 instrument operator's manual. 3rd eds. Roche Diagnostics. Germany. P. 17.
- Roche. 2023. High pure PCR template preparation kit. 28th eds. Roche Diagnostics. Germany. 16 pages.
- Roche. 2024. LightCycler® 480 Detection Formats [Online]. Available: <https://lifescience.roche.com/global/en/article-listing/article/lightcycler-480-detection-formats.html>. Accessed October 1, 2024.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J. and Andrade, M.J. 2015. Design of primers and probes for quantitative Real-Time PCR methods. *Methods in Molecular Biology*. 1275: 31-56.
- WOAH. 2024. Bovine spongiform encephalopathy. [Online]. Available: <https://www.woah.org/en/disease/bovine-spongiform-encephalopathy/>. Accessed May 17, 2024.
- Xie, Q., Lin, J., Qin, Y., Zhou, J. and Bu, W. 2011. Structural diversity of eukaryotic 18S rRNA and its impact on alignment and phylogenetic reconstruction. *Protein & Cell*. 2(2): 161-170.
- [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed June 10, 2023.
- [Online]. Available: <https://eurofinngenomics.eu/>. Accessed June 12, 2023.