

# การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระปือ แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

พลิศา มหาชัย\* วันทนา จันทรมงคล

## บทคัดย่อ

การควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์และการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นประเด็นสำคัญในการรักษามาตรฐานความปลอดภัยของอาหารสัตว์ งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระปือ แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค โดยใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR เทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระปือ แพะ และแกะได้ภายในปฏิกิริยาเดียว โดยมีสภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาตร Probes master ที่ความเข้มข้น 2X เท่ากับ 13  $\mu\text{L}$  ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer ของกระปือ และแกะเท่ากับ 0.4  $\mu\text{Mol/L}$  และของแพะเท่ากับ 0.5  $\mu\text{Mol/L}$  ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายของ probe ของกระปือ และแกะเท่ากับ 0.2  $\mu\text{Mol/L}$  และของแพะเท่ากับ 0.25  $\mu\text{Mol/L}$  โดยค่า cut-off ของกระปือ แพะ และแกะ เท่ากับ 27.92, 36.96 และ 37.62 ตามลำดับ วิธีนี้สามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระปือ แพะ และแกะ ได้ในระดับต่ำสุด 0.1% (w/w) อีกทั้งสามารถจำแนกเนื้อสัตว์เป้าหมายและไม่ใช่เป้าหมายได้อย่างชัดเจน มีค่าความไวของวิธีทดสอบ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบเท่ากับ 100% ดังนั้น เทคนิค Multiplex Real-time PCR จึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัดต้นทุนเหมาะสำหรับการตรวจสอบชนิดสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ และสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ :** การปนเปื้อน อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค Multiplex Real-time PCR

เลขทะเบียนวิชาการ: 68(2)-0304-054

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

\*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: อีเมลล์ palisa.mhc@gmail.com

# Development and validation of a Multiplex Real-time PCR method for detecting buffalo, goat and ovine DNA in cattle feed

Palisa Mahachai\* Wantana Jantaramongkon

## Abstract

The control of animal feed quality and the monitoring of contamination with mammalian meat and bone meal (MBM) in ruminant feed are essential components of feed safety regulation. This study aimed to develop and validate a Multiplex Real-time PCR assay for the detection of buffalo, goat, and sheep DNA in commercial cattle feed. The optimized reaction conditions were determined as follows: 13  $\mu$ L of 2X Probes Master Mix, final primer concentrations of 0.4  $\mu$ Mol/L for buffalo and sheep and 0.5  $\mu$ Mol/L for goat, and probe concentrations of 0.2  $\mu$ Mol/L for buffalo and sheep and 0.25  $\mu$ Mol/L for goat. The established cut-off cycle threshold (Ct) values were 27.92, 36.96, and 37.62 for buffalo, goat, and sheep, respectively. The method successfully detected DNA contamination originating from these species at a minimum level of 0.1% (w/w) and effectively distinguished target from non-target species. The assay demonstrated 100% sensitivity, 100% specificity, and 100% efficiency. Therefore, the developed Multiplex Real-time PCR method represents a simple, rapid, and cost-effective approach for species identification in feed products. It serves as a reliable analytical tool for contamination monitoring and surveillance in accordance with Animal Feed Quality Control Act B.E. 2558 (A.D. 2015)

**Keywords:** contamination, cattle feed, Multiplex Real-time PCR

---

Registered No. : 68(2)-0304-054

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

\*Corresponding author: e-mail: palisa.mhc@gmail.com

## บทนำ

โรควัวบ้าหรือ Bovine spongiform encephalopathy (BSE) เป็นโรคที่แพร่ระบาดในโค ในช่วงปี ค.ศ. 1980 และปี ค.ศ. 1990 ส่งผลให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรงต่อภาคเกษตรและอาหาร และเป็นภัยคุกคามที่อาจเกิดขึ้นต่อสุขภาพประชาชน (Ducrot *et al.*, 2013) เนื่องจากโคที่เป็นโรคนี้นี้จะมีอาการทางประสาท ทำให้เกิดความเสียหายและอัตราการตายสูง ถึง 100% ยังสามารถติดต่อสู่สัตว์ชนิดอื่นรวมถึงมนุษย์ได้ (จิรา, 2546) ในช่วงแรกการสืบสวนทางระบาดวิทยาเพื่อพยายามค้นหาเบาะแสเกี่ยวกับสาเหตุของโรค พบว่ามีความเชื่อมโยงการระบาดของโรคกับฟาร์มที่ให้เนื้อและกระดูกป่นเป็นอาหารเสริมโปรตีน (Wilesmith *et al.*, 1988) ผลการทดลองเพิ่มเติมระบุได้ว่าการใช้เนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์เป็นเส้นทางหลักในการติดเชื้อโรควัวบ้าในโค (Wilesmith *et al.*, 1991)

สหภาพยุโรป (European Union) มีการบังคับใช้มาตรการเสริม ตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา และกำหนดห้ามใช้โปรตีนของเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการ (processed animal proteins, PAPs) รวมทั้งเนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal) เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ (European Commission, 2001; European Commission, 2002 European Commission, 2003; Olsvik *et al.*, 2017) การห้ามใช้เนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์มีผลอย่างมากในการลดการระบาดของโรคในสหภาพยุโรป แต่ยังไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างเต็มที่ (Ducrot *et al.*, 2013) ในช่วง 5 ปีต่อมา ยังมีการตรวจพบการระบาดของโรคในสหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส รวมถึงในประเทศอื่นๆ เช่น ไอร์แลนด์เหนือ สวิตเซอร์แลนด์ (Denny and Hueston, 1997; Doherr *et al.*, 2002; Abrial *et al.*, 2005; Allepuz *et al.*, 2007; Schwermer and Heim, 2007; Ducrot *et al.*, 2013) ทั้งนี้องค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) ยังมีรายงานการตรวจพบโรควัวบ้าในประเทศต่างๆ แม้ว่าประเทศไทยนั้นจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่ไม่พบการรายงานสถานการณ์ความเสี่ยงของโรควัวบ้าอย่างเป็นทางการ (WOAH, 2024) แต่ปัญหาดังกล่าวอาจเป็นอุปสรรคต่อการส่งออกอาหารสัตว์ของไทยในอนาคต

สำหรับประเทศไทยนั้น ได้มีการกำหนด “ห้ามใช้เนื้อป่น เนื้อป่นสกัดไขมัน เนื้อและกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนผสมในการผลิตสำหรับอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง” ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) โดยวิธีสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นของสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ของกรมปศุสัตว์มี 2 วิธี คือ วิธีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic) และวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม (deoxyribonucleic acid, DNA) ด้วยเทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) ซึ่งวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง สามารถตรวจหาปริมาณลำดับจีโนมเพียง 1 copy ได้ (single-copy genomic sequences) (Saiki *et al.*, 1988)

Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกรอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ยังไม่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา (Arya *et al.*, 2005) โดยใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้น

ขณะที่ดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกรอบตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (Real-time detection) ปริมาณแสงที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณผลผลิต PCR ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาแบบทวีคูณ(exponential amplification) ในลักษณะกราฟรูปตัว S (s-shape/sigmoid curve) การวัดการเพิ่มจำนวนของผลผลิต PCR ในเทคนิค Real-time PCR มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือการใช้ hydrolysis probe (TaqMan probe) โดยในหลอดปฏิกิริยาที่มี DNA polymerase และสารจำเป็นในการเพิ่มปริมาณ PCR ในบัฟเฟอร์จะมีคู่ไพรเมอร์ (primer) จำเพาะสำหรับดีเอ็นเอเป้าหมาย และมี probe ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น (10-20 bp) ที่มีสารเรืองแสง (reporter) เครื่องจึงเห็นสัญญาณแสงจาก reporter และบันทึกปริมาณแสงที่เกิดขึ้นไว้ทุกๆรอบจนครบรอบการทำปฏิกิริยา (40-45 รอบ) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2563)

เทคนิค Multiplex PCR เป็นเทคนิคการทำ PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันที่สภาวะของเครื่องเดียวกันได้ผลในคราวเดียว ทำให้ประหยัดระยะเวลา สารเคมี และลดขั้นตอนในการปฏิบัติงาน (Elnifro *et al.*, 2000) การทำ Multiplex PCR จึงต้องคำนึงถึงการออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายหรือ DNA template แต่ละคู่ควรออกแบบโดยไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเออื่น ในสภาวะของปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อให้สามารถขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากัน เนื่องจากในปฏิกิริยามี primer หลายคู่ (สุรสีและคณะ, 2540) เทคนิคนี้เริ่มถูกใช้เป็นทางเลือกในงานวิจัยด้านสินค้าปศุสัตว์ เช่น

Dalmasso *et al.* (2004) ใช้ Multiplex PCR จำแนกชนิดสัตว์ที่นิยมใช้ผลิตอาหารในโรงงานอาหารแปรรูป โดย primer ถูกออกแบบจากดีเอ็นเอบริเวณไมโทคอนเดรีย (12S rRNA, tRNA Val และ 16S rRNA) พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบของปลาเท่ากับ 0.004% และสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก สุกร เท่ากับ 0.002% งานวิจัยนี้จึงถือเป็นทางเลือกในการตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกป่นที่มีความถูกต้องแทนวิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์

Izadpanah *et al.* (2018) ได้พัฒนาวิธี Multiplex PCR เพื่อตรวจสอบแหล่งที่มาของเนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงบริเวณ cytochrome C oxidase subunit I (COX1) ในไมโทคอนเดรีย วิธีนี้สามารถจำแนกแหล่งที่มาของสุกร อูฐ แกะ ลา แพะ โค และไก่ได้ ในการทดลองเดียวโดยวิเคราะห์ชนิดตามขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้

Guo *et al.* (2020) ได้พัฒนาวิธีการตรวจ Triplex TaqMan Real-time PCR ให้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอแพะและแกะในผลิตภัณฑ์เนื้อและนมได้ โดยมีค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบในเนื้อแกะสดและแปรรูปที่ 0.001 ng และ 0.01 ng ตามลำดับ และในเนื้อแพะ นมแพะ และชีสจากนมแพะที่ 0.00025 ng, 0.005 ng และ 0.01 ng ตามลำดับ

Singh *et al.* (2024) ได้พัฒนาวิธีการตรวจแยกชนิดเนื้อไก่ สุกร แกะ และแพะ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปตามท้องตลาด ด้วยการใช้ TaqMan Multiplex probe-based RT-qPCR โดยออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงจากดีเอ็นเอบริเวณไมโทคอนเดรีย พบว่าสามารถตรวจหาปริมาณชนิดเนื้อสัตว์กับผลิตภัณฑ์แปรรูปตามท้องตลาดได้ต่ำสุดที่ 0.1 pg/ $\mu$ L

จากงานวิจัยที่ได้ค้นคว้า ยังไม่พบการตรวจหาชนิดดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR และปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ มีการตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์สำเร็จรูป 6 ชนิดเนื้อสัตว์ ได้แก่ โค แพะ แกะ สุนัข กระบือ และม้า ด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR ได้เท่า่นั้น และจากข้อมูลงานวิจัยข้างต้น จึงมีความสำคัญต่อห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่จะพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาชนิดดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR แทนการใช้วิธี Singleplex Real-time PCR แบบเดิม เพื่อยกระดับประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ ให้สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนจากสัตว์หลายชนิดได้ภายในปฏิกิริยาเดียว ลดต้นทุน และระยะเวลาในการดำเนินการ โดยคงไว้ซึ่งความถูกต้อง และความเที่ยงตรงของผลการทดสอบ การดำเนินงานประกอบด้วยการพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR ได้แก่ การทดสอบการติดสี probe ของแพะและ แกะ การเปรียบเทียบรอบในการทำปฏิกิริยาของกระป๋อง และการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น การทดสอบหาปริมาณต่ำสุด การทดสอบหาความจำเพาะ และการคำนวณหาค่าความไวของวิธีทดสอบ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ รวมทั้งการใช้วิธีที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้วตรวจหาดีเอ็นเอกระป๋อง แพะ และแกะกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่ส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้จากการพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจะช่วยเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 LightCycler<sup>®</sup> 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  $\mu$ L
- 1.8 Microcentrifuge ขนาด 1.5 mL (Eppendorf, Germany)
- 1.9 LightCycler<sup>®</sup> 8-Tube Strips (white) (Roche, Germany)

### 2. สารเคมี

- 2.1 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany)
- 2.2 Probe and primer specific to Buffalo (Biolegio, The Netherlands)
- 2.3 Probe and primer specific to Goat (Biolegio, The Netherlands)
- 2.4 Probe and primer specific to Ovine (Biolegio, The Netherlands)
- 2.5 Isopropanol, molecular grade (Sigma Aldrich, Germany)
- 2.6 Distilled water, PCR grade (Apsalagen, Thailand)
- 2.7 LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes master (Roche, Germany)

### 3. ตัวอย่างที่ศึกษา

#### 3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่ส่งตรวจกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ปี 2567 และไม่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และ แกะ จากการทดสอบด้วย Singleplex Real-time PCR มาใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ดจำนวน 10 ตัวอย่าง และชนิดผงจำนวน 10 ตัวอย่าง

#### 3.2 ตัวอย่างทดสอบที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการงานจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ภายใต้กิจกรรมตรวจรับรองคุณภาพอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ในระหว่างปีงบประมาณ 2567-2568 จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ดจำนวน 8 ตัวอย่าง และชนิดผงจำนวน 12 ตัวอย่าง

#### 4. ตัวอย่างควบคุม

4.1 Positive control คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อกระป๋อง เนื้อแพะ และเนื้อแกะ

4.2 Negative control คือ Distilled water, PCR grade ทดแทนการใช้ดีเอ็นเอเป้าหมาย

4.3 Negative extraction control คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคข้อ 3 ชนิดละ 1 ตัวอย่าง

#### 5. วิธีการทดลอง

##### 5.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่าง สกัดตามวิธีการที่กำหนดในคู่มือน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 2023) ดังนี้

- ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ 25 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL
- เติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200  $\mu$ L ลงในตัวอย่าง และเติม proteinase K ปริมาตร 40  $\mu$ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- นำไปบ่มในเครื่อง heating block ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม binding buffer ปริมาตร 200  $\mu$ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และเติม isopropanol ปริมาตร 100  $\mu$ L ผสมให้เข้ากัน
- ดูดของเหลวส่วนใสถ่ายลงในหลอด filter ที่วางบนหลอด collection หลอดที่ 1
- บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (heating block) เป็นเวลา 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในหลอด collection ที่ 1
- เติม inhibitor removal ปริมาตร 500  $\mu$ L
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายหลอด filter ใส่ในหลอด collection หลอดที่ 2
- เติม wash buffer ปริมาตร 500  $\mu$ L ลงในหลอด filter
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่ไหลผ่าน filter ที่ 2 (เติม wash buffer และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง)
- ย้ายหลอด filter ใส่ในหลอด collection หลอดที่ 3
- นำไปปั่นเหวี่ยงต่อทันทีที่ 14,000  $\times$  g เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม elution buffer (ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200  $\mu$ L
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 1 นาที
- ดูดของเหลวที่ได้ในหลอด collection หลอดที่ 3 (ตัวอย่างดีเอ็นเอ) ลงใน microcentrifuge tube วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop) ที่ OD260 โดยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ควรอยู่ในช่วง 10-60  $\mu$ g/mL และวัดค่าความบริสุทธิ์โดยวัดค่า Ratio A260/A280 ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

5.2 การพัฒนาวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโคด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

### 5.2.1 การติดสี probe ของกระบือ แพะ และแกะ

ทดสอบการติดสี probe ของกระบือ แพะ และแกะ โดยใช้ primer และ probe อ้างอิงตามตารางที่ 1 การติดด้วยฉลากสี fluorescent dye กับตัวอย่าง Positive control ในการทดสอบที่ตำแหน่ง 5' region ดังนี้ สี FAM กับ probe กระบือ แพะ และแกะ สี HEX กับ probe แพะ และสี CY5 กับ probe แกะ ตรวจสอบกราฟ และค่า Cycle threshold (Ct) โดยตั้งค่าสภาวะเครื่องตามตารางที่ 2 ด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR

### 5.2.2 การปรับค่าปฏิกิริยาของกระบือ

การปรับค่าปฏิกิริยา โดยการทดสอบจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาของกระบือ โดยเพิ่มจำนวนรอบเป็น 45 รอบ เปรียบเทียบผลการตั้งค่าปฏิกิริยาจากความแตกต่างของค่า Ct ที่ได้จากการทดสอบ ข้อ 5.2.1 ที่ตั้งค่าจำนวนรอบ 40 รอบ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ และเวลาที่เหมือนกันทุกขั้นตอน ดังตารางที่ 2 โดยใช้ตัวอย่าง Positive control ของกระบือในการทดสอบ ด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR

ตารางที่ 1 primer และ probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของกระบือ แพะ และแกะ

| ชนิดสัตว์        | Primer /Probe | DNA sequence (5'-3')          | ความจำเพาะ                 | อ้างอิง                       |
|------------------|---------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| กระบือ (Buffalo) | F primer      | TCAGCCCCAAGAAAAATAAACCA       | ยีน 16S mitochondrial gene | Drummond <i>et al.</i> (2013) |
|                  | R primer      | GTCACCCCAACCGAAACTGT          |                            |                               |
|                  | probe         | TAAGGARTAACACAMTCT            |                            |                               |
| แพะ (Goat)       | F primer      | GGAAGGAAAGAGAATGGGGATATGG     | ดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9 | ISO/TS 20224-5:2020           |
|                  | R primer      | TCTCCACACACAGCCAAAACC         |                            |                               |
|                  | probe         | ATCCATCTCTCCCTCCACTCCCTGCCTAA |                            |                               |
| แกะ (Ovine)      | F primer      | CCAACATGCCTTTAAACCCTCAA       | ดีเอ็นเอบนยีน Beta actin   | ISO/TS 20224-2:2020           |
|                  | R primer      | GGAAGTGTAGCCTTCTGACTCG        |                            |                               |
|                  | probe         | TGCCTTTCCTTCCCGCCAGTCTC       |                            |                               |

หมายเหตุ F primer คือ Forward primer และ R primer คือ Reverse primer

ตารางที่ 2 การตั้งค่าสภาวะเครื่อง LightCycler® 480 II Real-time PCR

| Programs                                      |                                            | Temperature (°C) | Hold (hh:mm:ss) |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|-----------------|
| Pre-incubation                                |                                            | 95               | 00:10:00        |
| Amplification (Analysis mode: Quantification) | denaturation                               | 95               | 00:00:15        |
|                                               | annealing and extension                    | 60               | 00:01:00        |
|                                               | (40 รอบ สำหรับกระบือ 45 รอบ สำหรับแพะ แกะ) |                  |                 |
| Cooling (Analysis mode: None)                 |                                            | 40               | 00:00:30        |



### 5.2.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมของกระป๋อง แพะ และแกะ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

โดยการนำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผง ที่ไม่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ มาผสมเนื้อกระป๋อง แพะ และแกะ เพื่อให้มีระดับการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้น 1% ชนิดละ 2 ตัวอย่าง ปรับพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ 1) ความเข้มข้นของ Magnesium Chloride ( $MgCl_2$ ) โดยปรับปริมาตร Probes master 2) ความเข้มข้นของ primer

ทดสอบความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  และปริมาณของ Taq DNA polymer โดยปรับปริมาตร Probes master โดยอ้างอิงการทำ Singleplex Real-time PCR ที่ 12.5  $\mu L$ /reaction และเพิ่มปริมาตร ที่ 13  $\mu L$ /reaction และ 15  $\mu L$ /reaction และทดสอบความเข้มข้นของ primer โดยปรับปริมาตรความเข้มข้นสุดท้ายของ primer กระป๋องและแพะ ให้เท่ากับ 0.40  $\mu MoL/L$  และ 0.48  $\mu MoL/L$  ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer แพะ เท่ากับ 0.40  $\mu MoL/L$ , 0.48  $\mu MoL/L$  และ 0.5  $\mu MoL/L$  ใช้ความเข้มข้น probe ครึ่งหนึ่งของความเข้มข้น primer ดังตารางที่ 3 เตรียมน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา เพื่อใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ให้มีปริมาตรรวม 20  $\mu L$ /reaction และผสมดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10-60  $\mu g/mL$  ปริมาตร 5  $\mu L$ /reaction รวมทั้งสิ้น 25  $\mu L$ /reaction ทดสอบปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler<sup>®</sup> 480 II โดยกำหนดค่าอุณหภูมิ เวลาตามตารางที่ 2 และใช้จำนวนรอบในการวิเคราะห์ 45 รอบ

ตารางที่ 3 การปรับปริมาตร Probes master และความเข้มข้นสุดท้ายของ primer และ probe

| สภาวะ<br>ที่ | ปริมาตร<br>Probes<br>master (2X)<br>$\mu L$ /reaction | ความเข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>primer<br>กระป๋อง<br>$\mu MoL/L$ | ความเข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>probe<br>กระป๋อง<br>$\mu MoL/L$ | ความเข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>primer แพะ<br>$\mu MoL/L$ | ความ<br>เข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>probe<br>แพะ<br>$\mu MoL/L$ | ความเข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>primer แกะ<br>$\mu MoL/L$ | ความเข้มข้น<br>สุดท้ายของ<br>probe แกะ<br>$\mu MoL/L$ |
|--------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1            | 12.5                                                  | 0.4                                                           | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                   |
| 2            | 13                                                    | 0.4                                                           | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                   |
| 3            | 15                                                    | 0.4                                                           | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                          | 0.4                                                    | 0.2                                                   |
| 4            | 13                                                    | 0.48                                                          | 0.24                                                         | 0.48                                                   | 0.24                                                         | 0.48                                                   | 0.24                                                  |
| 5            | 15                                                    | 0.48                                                          | 0.24                                                         | 0.48                                                   | 0.24                                                         | 0.48                                                   | 0.24                                                  |
| 6            | 13                                                    | 0.4                                                           | 0.2                                                          | 0.5                                                    | 0.25                                                         | 0.4                                                    | 0.2                                                   |

ประมวลผลปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยพิจารณาจากค่า Ct และกราฟของการตรวจจำแนกดีเอ็นเอ ต้องพบค่า Ct ของ Positive control ไม่พบค่า Ct ของ Negative control และ Negative extraction control ในทุกรอบของการทดสอบ

### 5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

#### 5.3.1 ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น (Pre-Limit of Detection; Pre-LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผง ที่ไม่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ มาผสมเนื้อกระบือ แพะ และแกะ ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 0.5%, 0.1% และ 0.01% (w/w) ชนิดละ 3 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 5.1 และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

#### 5.3.2 ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

เตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผงที่ปนเปื้อนเนื้อกระบือ แพะ และแกะ ที่ระดับความเข้มข้นที่ปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นจาก ข้อ 5.3.1 ชนิดละ 5 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 5.1 ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำมาตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR และหาค่า cut-off โดยพิจารณาจากค่า Ct ของการตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ

#### 5.3.3 ขั้นตอนการทดสอบหาความจำเพาะ

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผงที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ชนิดอื่นเป็น non-target species ประกอบด้วยเนื้อสุกร เนื้อม้า เนื้อโค และเนื้อไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 1% (w/w) ชนิดละ 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ ประกอบด้วย ข้าวโพด รำ ปลาป่น และกากถั่วเหลือง ชนิดละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

#### 5.3.4 การคำนวณ

คำนวณหาค่า ความไวของวิธีทดสอบ (sensitivity) ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (specificity) และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (efficiency) (Silva, R. B. and Ellison, S. L. R., 2021)

##### 5.3.4.1 ความไวของวิธีทดสอบ (sensitivity)

หาค่า Sensitivity หรือ อัตราผลบวกจริง (true positive rate) โดยใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอกระบือ แพะ และแกะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค คำนวณตามสูตรดังนี้

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

เมื่อ  $tp$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลพบดีเอ็นเอกระบือ แพะ และแกะในตัวอย่างที่ปนเปื้อนเนื้อกระบือ แพะ และแกะ )

$fn$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลไม่พบดีเอ็นเอกระบือ แพะ และแกะในตัวอย่างที่ปนเปื้อนเนื้อกระบือ แพะ และแกะ)

#### 5.3.4.2 ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (specificity)

หาค่า Specificity หรือ อัตราผลลบจริง (true negative rate) โดยใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบหาความจำเพาะ คำนวณตามสูตรดังนี้

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

เมื่อ  $tn$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลไม่พบดีเอ็นเอกระบือแพะ และแกะในตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนเนื้อกระบือ แพะ และแกะ)

$fp$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลพบดีเอ็นเอกระบือแพะ และแกะในตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนเนื้อกระบือ แพะ และแกะ)

#### 5.3.4.3 ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (efficiency)

หาค่า Efficiency โดยใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุด และขั้นตอนการทดสอบหาความจำเพาะมาคำนวณตามสูตร ดังนี้

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

เมื่อ  $tp$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง

$tn$  คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง

$p$  คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ( $tp + fp$ )

$n$  คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลลบ ( $tn + fn$ )

5.4 การตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะในตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการงานจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผง ตามขั้นตอนในข้อที่ 5.1 และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบด้วยวิธีทดสอบที่ได้จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

### ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

#### 1.1 ผลทดสอบการติดสี probe ของ แพะ และแกะ

ในการพัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR เพื่อจำแนกดีเอ็นเอของชนิดสัตว์หลายชนิดพร้อมกัน มีการเปลี่ยนสีของ probe เพื่อรองรับการอ่านหลายช่องสัญญาณด้วยเครื่อง Real-time PCR เนื่องจาก fluorescent dye ที่เลือกใช้มีช่วงความยาวคลื่น excitation/emission ที่แตกต่างจาก FAM อย่างชัดเจน โดยเลือกใช้สีของ probe ดังนี้ probe ของกระบือ FAM (excitation ~449 nm, emission ~520 nm) probe ของแพะเปลี่ยนจาก FAM (excitation ~495 nm, emission ~520 nm) เป็น HEX (excitation ~535 nm, emission ~556 nm) และ probe ของแกะเปลี่ยนจาก FAM เป็น Cy5 (excitation ~649 nm, emission ~670 nm) เพื่อแก้ปัญหาที่ probe เดิมทั้งสามชนิดที่ใช้ FAM เหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถตรวจพร้อมกันด้วย Multiplex real-time PCR ได้ เนื่องจากสัญญาณถูก

ตรวจจับในช่องเดียวกัน (Heid *et al.*, 1996; Marras, 2006) การใช้ HEX และ Cy5 ซึ่งมีสเปกตรัมเรืองแสงแตกต่างจาก FAM อย่างชัดเจนช่วยลดการทับซ้อนของสัญญาณ และทำให้เครื่อง Real-time PCR สามารถแยกการตรวจจับของดีเอ็นเอแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองพบว่าลักษณะกราฟการขยาย และค่า Ct ของ probe HEX และ Cy5 ใกล้เคียงกับ probe FAM ซึ่งบ่งชี้ว่า probe ที่เปลี่ยนสีสามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์ คงความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย และสามารถนำไปใช้ใน Multiplex real-time PCR ได้อย่างเหมาะสม

## 1.2 ผลการปรับค่าปฏิกิริยา

ผลทดสอบเปรียบเทียบความแตกต่างของการปรับจำนวนรอบการตั้งค่าสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ของกระป๋องที่จำนวนรอบ 40 และ 45 รอบ หากจำนวนรอบของปฏิกิริยาแตกต่างกันจำเป็นต้องปรับจำนวนรอบให้เท่ากัน เมื่อต้องทดสอบหาดีเอ็นเอของชนิดสัตว์เป้าหมายที่มีจำนวนมากกว่า 1 ชนิดต้องเลือกจำนวนรอบที่ครอบคลุมดีเอ็นเอทั้งหมด โดยทั่วไปต้องเลือกจำนวนรอบที่สูงที่สุดในชุดการตั้งค่าสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยา (Mackay 2002, ISO/TS 20224-5: 2020) พบว่า ค่า Ct ในตัวอย่าง Positive control ของกระป๋อง ที่ 40 รอบ อยู่ในช่วง 16.39-16.75 และค่า Ct 45 รอบ อยู่ในช่วง 16.28-16.73 เมื่อเปรียบเทียบค่าทั้งสองสถานะด้วยการทดสอบค่าเฉลี่ยแบบ t-test พบว่าค่า  $p$  เท่ากับ 0.444126 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดที่  $p < 0.05$  แสดงให้เห็นว่าค่า Ct จากจำนวนรอบในการวิเคราะห์ 40 รอบ และ 45 รอบ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสามารถปรับตั้งค่าสถานะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาที่ 45 รอบได้

## 1.3 ผลการทดสอบหาสถานะปฏิกิริยาที่เหมาะสม

การทำ Multiplex Real-time PCR ของกระป๋อง แพะ และแกะ ทำโดยปรับปริมาตร Probes master ที่ความเข้มข้น 2X และปรับความเข้มข้นของ primer ตามตารางที่ 3 พบว่า สถานะที่ 1 พบดีเอ็นเอของกระป๋องในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ พบดีเอ็นเอแกะบางตัวอย่างที่ทดสอบ แต่ไม่พบดีเอ็นเอของแพะ จึงเพิ่มปริมาตร Probes master ในสถานะที่ 2 และสถานะที่ 3 ผลของการเพิ่มปริมาตร Probes master ในสถานะที่ 2 และ สถานะที่ 3 ให้ผลเหมือนกัน คือ พบดีเอ็นเอของกระป๋อง และแกะ ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ แต่ไม่พบดีเอ็นเอของแพะ และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของ primer ทุกตัวเท่ากับ 0.48  $\mu\text{Mol/L}$  ในสถานะที่ 4 และ 5 ผลการทดสอบสถานะที่ 4 และสถานะที่ 5 พบดีเอ็นเอของกระป๋องในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ พบดีเอ็นเอแพะ และแกะ ในบางตัวอย่างที่ทดสอบดังตารางที่ 4 จากสถานะที่ 1 2 และ 3 พบว่าการปรับ Probes master ทำให้ตรวจพบดีเอ็นเอได้ดีขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Lorenz (2012)  $\text{Mg}^{2+}$  ใน Probes master เป็นโคแฟกเตอร์สำคัญที่ช่วยเพิ่มการทำงานของ Taq DNA polymerase ซึ่งจะช่วยให้เพิ่ม amplification rate ของดีเอ็นเอส่งผลต่อความไวของปฏิกิริยา การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ  $\text{Mg}^{2+}$  ผลผลิต PCR จะเพิ่มขึ้นตาม ควรระวังการใช้  $\text{Mg}^{2+}$  ความเข้มข้นสูงจะเพิ่มโอกาสในการจับกับ primer แบบไม่จำเพาะและการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่พึงประสงค์ได้ และการปรับความเข้มข้น primer ในสถานะที่ 4 และ 5 ทำให้ผลการตรวจพบดีเอ็นเอแพะเพิ่มขึ้นส่วนแกะลดลงสอดคล้องกับรายงานของ Brownie *et al.* (1997) ที่พบว่า ปริมาณ primer ที่ใช้จะต้องเหมาะสมต่อปฏิกิริยา ซึ่งหากใช้ primer ในปริมาณที่มีสัดส่วนมากเกินไปอาจเกิดการจับคู่กันของ primer ทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้ไม่ใช่ผลผลิต PCR จากดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นในสถานะที่ 6 เพื่อป้องกัน  $\text{Mg}^{2+}$

ความเข้มข้นสูงเกินไปจึงเลือกปริมาณ Probes master ของสถานะที่ 2 คือ 13  $\mu\text{L}$  และป้องกันการเกิด การจับคู่กันของ primer ในการตรวจดีเอ็นเอของกระป๋อง และแกะ จึงใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer เท่ากับ 0.4  $\mu\text{Mol/L}$  และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของ primer แพะ เท่ากับ 0.5  $\mu\text{Mol/L}$  ผลทดสอบ สถานะที่ 6 พบดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ รายละเอียดดังตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของแพะแปรผันตรงกับความเข้มข้นสุดท้ายของ primer เมื่อ ความเข้มข้นของ primer เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้ผลผลิต PCR เพิ่มมากขึ้นด้วย (ปิยะนุชและคณะ, 2564) ทั้งนี้ปริมาณ Probes master และความเข้มข้นสุดท้ายของ primer เหมาะสมกับส่วนผสมของ ปฏิกิริยาของการตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ คือ Probes master ที่ความเข้มข้น 2X ปริมาตร 13  $\mu\text{L}$  ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer ของกระป๋อง และแกะเท่ากับ 0.4  $\mu\text{Mol/L}$  ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer ของแพะเท่ากับ 0.5  $\mu\text{Mol/L}$  เหมาะสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยา

**ตารางที่ 4** ผลการตรวจหาดีเอ็นเอโค แพะ แกะ และกระป๋อง ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่ สถานะต่างๆ

| สถานะที่ | จำนวนตัวอย่าง /จำนวนตัวอย่างที่พบดีเอ็นเอ (ร้อยละ) |           |           |
|----------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|
|          | กระป๋อง                                            | แพะ       | แกะ       |
| 1        | 4/4 (100)                                          | 4/0 (0)   | 4/2 (50)  |
| 2        | 4/4 (100)                                          | 4/0 (0)   | 4/4 (100) |
| 3        | 4/4 (100)                                          | 4/0 (0)   | 4/4 (100) |
| 4        | 4/4 (100)                                          | 4/3 (75)  | 4/2 (50)  |
| 5        | 4/4 (100)                                          | 4/3 (75)  | 4/2 (50)  |
| 6        | 4/4 (100)                                          | 4/4 (100) | 4/4 (100) |

## 2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

### 2.1 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น

การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นที่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ใน ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด และชนิดผง ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1%, 0.5%, 0.1% และ 0.01% (w/w) โดยพิจารณาจากค่าของ Cycle threshold (Ct) ในทุกตัวอย่าง ทดสอบ ผลการทดสอบพบว่า ตรวจพบดีเอ็นเอได้ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.1% (w/w) ในขณะที่ระดับ 0.01% (w/w) ไม่สามารถตรวจพบค่า Ct ได้ ดังนั้น ปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นที่ตรวจพบ ดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ คือ 0.1% (w/w) เมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Dalmasso *et al.* (2004) ที่พัฒนาวิธี Multiplex PCR สำหรับจำแนกชนิดสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ค่า LOD ของเนื้อสัตว์และ สัตว์ปีกอยู่ที่ 0.002–0.004% (w/w) ซึ่งต่ำกว่าค่า LOD ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากเมทริกซ์ตัวอย่างที่วิจัย เป็นอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป อาจมีสารรบกวน เช่น โปรตีน และไขมันปนเปื้อนสูงกว่าเนื้อสัตว์โดยตรง ทำให้ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต่ำกว่า ซึ่งอาจลดประสิทธิภาพของการขยายดีเอ็นเอ (Mafra *et al.*, 2008, Lorenz, 2012) อย่างไรก็ตาม LOD ที่ได้ยังอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ในห้องปฏิบัติการควบคุม คุณภาพอาหารสัตว์ เนื่องจากสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของกระป๋อง แพะ และแกะ ได้ที่ระดับ ความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% (w/w) เท่ากับการตรวจหาด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR

## 2.2 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุด

ในการประเมินค่า Ct ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 II กำหนดให้พิจารณาผลการตรวจวัดภายใน 40 รอบการขยายจากจำนวนรอบปฏิกิริยาทั้งหมด 45 รอบ โดยไม่นำค่าที่ได้จาก 5 รอบสุดท้ายของการขยายสัญญาณมาคำนวณ เนื่องจากสัญญาณในช่วงดังกล่าวมีค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) สูง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความเที่ยงและความถูกต้องของค่าที่วัดได้ (Roche, 2008) ดังนั้นผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่ 0.1% (w/w) จากการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น แปลผลจากค่า Ct ของดีเอ็นเอแต่ละชนิด จากนั้นหาค่า cut-off ของการตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ โดยคำนวณจากค่า Ct สูงสุด +3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (+3SD) ในทุกชนิดตัวอย่าง เพื่อประมาณการค่า cut-off หรือค่า Ct สูงสุดที่เป็นไปได้ในการตรวจพบดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% (w/w) ค่า Ct ของตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้นเท่ากันอาจแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น คุณภาพของส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR รวมถึงความแตกต่างของปริมาณสารพันธุกรรม (DNA/RNA) ในแต่ละตัวอย่าง (John, 2022) ปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อค่า Ct ที่ตรวจวัดได้ในแต่ละรอบการทดสอบ ดังนั้น การกำหนดค่า cut-off สำหรับการรายงานผลการทดสอบจึงคำนวณจากค่า Ct สูงสุดที่เป็นไปได้ของตัวอย่าง +3SD สำหรับตัวอย่างทุกชนิด

จากผลการทดสอบ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ทั้งชนิดเม็ด และชนิดผง จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% (w/w) โดยมีค่า Ct สูงสุดของกระป๋อง แพะ และแกะ เท่ากับ 25.23, 34.96 และ 35.54 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาร่วมกับค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดสอบ พบว่า ค่า cut-off ของดีเอ็นเอจากกระป๋อง แพะ และแกะ คือ ค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 27.92, 36.96 และ 37.62 ตามลำดับ ดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ผลการทดสอบหาค่า Cycle threshold (Ct) ของดีเอ็นเอกระป๋อง แพะ และแกะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.1 % (w/w)

| ตัวอย่างทดสอบ                                   | Cycle threshold |      |        |      |        |      |
|-------------------------------------------------|-----------------|------|--------|------|--------|------|
|                                                 | กระป๋อง         |      | แพะ    |      | แกะ    |      |
|                                                 | Max Ct          | +3SD | Max Ct | +3SD | Max Ct | +3SD |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดเม็ด (n = 10) | 25.23           | 2.63 | 34.96  | 1.88 | 35.53  | 1.96 |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคชนิดผง (n = 10)   | 23.90           | 2.30 | 34.63  | 2.16 | 35.54  | 2.22 |
| รวม (n=20)                                      | 25.23           | 2.69 | 34.96  | 2.00 | 35.54  | 2.08 |
| ค่า cut-off สำหรับการรายงานผลทดสอบ (Ct ≤)       | 27.92           |      | 36.96  |      | 37.62  |      |
| Positive control (เนื้อกระป๋อง แพะ และแกะ)      | 16.75           | 0.84 | 27.36  | 0.84 | 23.09  | 0.90 |
| Negative control (no template)                  | ไม่พบ           |      | ไม่พบ  |      | ไม่พบ  |      |

### 2.3 การทดสอบหาความจำเพาะ

จากผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex Real-time PCR กับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคทั้งชนิดเม็ด และชนิดผง ซึ่งเติมดีเอ็นเอของเนื้อสุกร เนื้อม้า เนื้อโค และเนื้อไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 1% (w/w) รวมทั้งวัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพด รำ ปลาป่น และกากถั่วเหลือง รวมจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบไม่พบค่า Ct แสดงให้เห็นว่าวิธี Multiplex Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูงต่อดีเอ็นเอของ กระบือ แพะ และแกะ โดยไม่ก่อให้เกิดการขยายสัญญาณที่ไม่จำเพาะ (non-specific amplification) หรือการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ผลการทดสอบในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Guo *et al.* (2020) ซึ่งพัฒนา Triplex TaqMan Real-time PCR สำหรับตรวจจำแนกดีเอ็นเอของ แพะและแกะในผลิตภัณฑ์เนื้อและนม โดยพบว่ามีค่าความจำเพาะสูงและไม่เกิด cross-amplification กับดีเอ็นเอของโค สุกร หรือไก่ ในทำนองเดียวกันกับ Singh *et al.* (2024) ที่พัฒนา Multiplex DNA probe-based PCR สำหรับตรวจการปลอมปนของเนื้อสัตว์หลายชนิด พบว่าสามารถจำแนกชนิดสัตว์ได้อย่างถูกต้องโดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามระหว่างชนิด นอกจากนี้ Izadpanah *et al.* (2018) รายงานการพัฒนา Multiplex Real-time PCR สำหรับตรวจแหล่งกำเนิดเนื้อสัตว์ โดยใช้ชุด primer จำเพาะต่อ ยีนไมโทคอนเดรีย (12S rRNA, Cytb, ND5) ให้ผลจำเพาะสูงโดยไม่เกิด cross-reactivity กับสัตว์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเป็นแบบ conventional PCR ที่ตรวจวิเคราะห์ผ่านการมองเห็นแถบบนเจล ทำให้ความจำเพาะต่ำกว่าวิธี Real-time PCR ที่ใช้ probe-based detection ในขณะที่ยานวิจัย Dalmasso *et al.* (2004) ซึ่งเป็นหนึ่งในงานบุกเบิกด้านการตรวจชนิดสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารด้วย Multiplex PCR assay พบว่าไม่เกิดการขยายสัญญาณผิดพลาดกับเนื้อสัตว์ต่างชนิดเช่นกัน แต่ยีนที่ใช้ (12S rRNA gene) จำเพาะในระดับสกุล (genus) มากกว่าระดับชนิด (species) จึงอาจไม่สามารถจำแนกสัตว์ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม เช่น โคและกระบือ ได้อย่างแม่นยำเท่าวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

### 2.4 การคำนวณ

การทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีค่าความไวของวิธีทดสอบ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบของการตรวจหาดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะมีค่าเท่ากันคือ 100% สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสามชนิดได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.1% (w/w) ตามตารางที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์สำเร็จรูปด้วยเทคนิค Singleplex Real-time PCR ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่าวิธี Multiplex Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ Singleplex Real-time PCR

**ตารางที่ 6** ค่าความไวของวิธีทดสอบ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ และประสิทธิภาพ (sensitivity, specificity และ efficiency) ของวิธีทดสอบ

|                                                           | จำนวนผลทดสอบที่ตรวจสอบ (n) |      |      |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|------|------|
|                                                           | กระป๋อง                    | แพะ  | แกะ  |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง ( <i>true negative, tn</i> )  | 20                         | 20   | 20   |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง ( <i>true positive, tp</i> ) | 20                         | 20   | 20   |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม ( <i>fn</i> )                 | 0                          | 0    | 0    |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม ( <i>fp</i> )                | 0                          | 0    | 0    |
| จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ( $p = tp + fp$ )         | 20                         | 20   | 20   |
| จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลลบ ( $n = tn + fn$ )          | 20                         | 20   | 20   |
| Sensitivity [ $tp / (tp + fn)$ ] × 100%                   | 100%                       | 100% | 100% |
| Specificity [ $tn / (tn + fp)$ ] × 100%                   | 100%                       | 100% | 100% |
| Efficiency [ $(tp + tn) / (p + n)$ ] × 100%               | 100%                       | 100% | 100% |

### 3. การตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะในตัวอย่างที่ส่งตรวจ

ผลตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค ทั้งชนิดเม็ด และชนิดผง รวมจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเนื้อหรือกระดูกปนของกระป๋อง แพะ และแกะในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ (คิดเป็นร้อยละ 0)

ผลการตรวจสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคที่นำมาวิเคราะห์มีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดของพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะประเภทวัตถุดิบ พ.ศ. 2558 ซึ่งกำหนดให้ “ห้ามใช้เนื้อปน เนื้อปนสกัดไขมัน และเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง” (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)

#### สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาการพัฒนาวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR พบว่า การเปลี่ยนสี probe เป็นสี HEX และ Cy5 ในแพะ และแกะ บ่งชี้ว่า probe ที่เปลี่ยนสีทำงานได้อย่างสมบูรณ์ สามารถนำไปใช้ใน Multiplex real-time PCR ได้ สภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการทำ Multiplex Real-time PCR ของกระป๋อง แพะ และแกะ ที่ปริมาตรรวม 25 µL/reaction จำนวน 45 รอบ คือ ปริมาตรของ Probes master ที่ความเข้มข้น 2X เท่ากับ 13 µL ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer และ probe ของกระป๋องเท่ากับ 0.4 และ 0.2 µMol/L ตามลำดับ ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer และ probe ของแพะเท่ากับ 0.5 และ 0.25 µMol/L ตามลำดับ และความเข้มข้นสุดท้ายของ primer และ probe ของแกะเท่ากับ 0.4 และ 0.2 µMol/L ตามลำดับ ค่า cut off ของกระป๋อง แพะ และแกะ เท่ากับ 27.92, 36.96 และ 37.62 ตามลำดับ โดยสามารถทดสอบที่ระดับการปนเปื้อนดีเอ็นเอ ของกระป๋อง แพะ และแกะ ต่ำสุดเท่ากับ 0.1% (w/w) และผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของกระป๋อง แพะ และแกะ มีค่าความไวของวิธีทดสอบ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ และ ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบเท่ากันที่ 100% สามารถลดระยะเวลาในการดำเนินการ และลดต้นทุนด้วยการลดปริมาณ reaction จากเดิม



3 reaction เป็น 1 reaction ดังนั้นวิธีตรวจหาชนิดดีเอ็นเอของกระบือ แพะ และแกะ ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโคด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR เหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการงานจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์

#### ข้อเสนอแนะ

สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีตรวจชนิดเนื้อสัตว์ที่สามารถตรวจได้พร้อมกันหลายชนิดในอาหารสัตว์เลี้ยง (สุนัขและแมว) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาชนิดเนื้อสัตว์ให้ตรงกับที่ระบุบนฉลากสินค้า ให้สอดคล้องกับพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 มาตรา 57 (1) “อาหารสัตว์ปลอมปน ได้แก่ อาหารสัตว์ตามมาตรา 6(1) ที่ใช้วัตถุดิบเป็นส่วนผสมไม่ตรงกับที่ขึ้นทะเบียนไว้ ยกเว้นวัตถุดิบซึ่งอาจมีตามธรรมชาติตามที่รัฐมนตรีประกาศกำหนด” เช่น ตรวจยืนยันชนิดเนื้อสัตว์ freeze dry ตรวจยืนยันชนิดสัตว์ที่ระบุบนฉลากอาหารสัตว์เลี้ยงสำเร็จรูป เป็นต้น

#### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ประธานและคณะกรรมการวิชาการ ข้าราชการและพนักงานงานจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

#### เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หมวด 8 การควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 4 ธันวาคม 2558. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 132 ตอนพิเศษ 322ง. น. 11-12.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2563. ใน Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR. ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา, บรรณาธิการ. บริษัท ศูนย์การพิมพ์แกนจันทร์ จำกัด. นนทบุรี. หน้า 5-6.
- จิรา คงครอง. 2546. โรควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy). โรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์. ISBN974-682-109-1. น. 80-85.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2540. ใน การใช้ cocktail primer ที่เหมาะสมในการตรวจไวรัสบนกล้วยไม้ด้วยวิธี multiplex RT-PCR. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35: สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตรอุตสาหกรรมเกษตร. 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. หน้า 204-214.
- ปิยนุช ศรชัย, ณัฐวดี บุญทองดี, ฐิติรัตน์ อัสวมงคลศิริ, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ . 2564. การปรับแต่งกรรมวิธีของปฏิกิริยาลูกโซ่พหุรีมอเรสสำหรับการตรวจสอบมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก. วารสารวิชาการเกษตร. 39(3). หน้า 248-259.

- Abrial, D., Calavas, D., Jarrige, N. and Ducrot, C. 2005. Poultry, pig and the risk of BSE following the feed ban in France--a spatial analysis. *Veterinary research*, 36(4): 615–628.
- Allepuz, A., López-Quílez, A., Forte, A., Fernández, G. and Casal, J. 2007. Spatial analysis of bovine spongiform encephalopathy in Galicia, Spain (2000-2005). *Preventive veterinary medicine*, 79(2-4): 174–185.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H.R. 2005. Basic principles of Real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2): 209–219.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., and Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic acids research*, 25(16), 3235–3241.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S. and Bottero, M.T. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and cellular probes*. 18(2): 81–87.
- Denny, G.O. and Hueston, W.D. 1997. Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995. *The Veterinary record*, 140(12). 302–306.
- Doherr, M.G., Hett, A.R., Rüfenacht, J., Zurbriggen, A., & Heim, D. 2002. Geographical clustering of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) born in Switzerland after the feed ban. *The Veterinary record*, 151(16), 467–472.
- 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.
- Ducrot, C., Paul M. and Calavas D. 2013. BSE risk and the use of meat and bone meal in the feed industry: perspectives in the context of relaxing control measures. *Natures Sciences Sociétés*. 21(1):3-12
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J. and Klapper, P.E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology*. (13): 559–570.
- 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.
- Guo, L., Yu, Y., Xu, W.L., Li, C.D., Liu, G.Q., Qi, L., Luo, J.X. and Guo, Y.S. 2020. Simultaneous detection of ovine and caprine DNA in meat and dairy products using triplex TaqMan Real-time PCR. *Food science & nutrition*. 8(12). 6467–6476.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. 1996. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- ISO/TS 20224-2: 2020. Animal feeding stuffs — Methods of analysis for the detection of animal species — Part 2: Bovine (*Bos taurus*). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 20224-5: 2020. Animal feeding stuffs — Methods of analysis for the detection of animal species — Part 5: Goat (*Capra hircus*). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Izadpanah, M., Mohebbali, N., Elyasi Gorji, Z., Farzaneh, P., Vakhshiteh, F. and Shahzadeh Fazeli, S.A. 2018. Simple and fast multiplex PCR method for detection of species origin in meat products. *Journal of food science and technology*. 55(2), 698–703.
- John P. 2022. Understanding Ct Values in Real-Time PCR. [Online] Available: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values/>. Accessed October 17, 2025.
- Lorenz T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments*. 63(e3998).
- Mackay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(1): 1–32.
- Mafra, I., Ferreira, M., and Oliveira, M. B. (2008). DNA extraction methods from highly processed soybean-based food products. *Food Research International*. 41(10): 1053-1061.
- Marras, S.A.E. 2006. Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Methods in Molecular Biology*, 335, 3–16.

- 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.
- 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.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839): 487-491.
- Schwermer, H. and Heim, D. 2007. Cases of bovine spongiform encephalopathy born in Switzerland before and after the ban on the use of bovine specified risk material in feed. *The Veterinary record*, 160(3): 73–77.
- Silva, R. B. and Ellison, S. L. R. (Eds).. 2021. Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. *Eurachem/CITAC guide*. 7-9.
- Singh Y.S., Tariq, R., Kumar P.P., Saxena, A., Rai, P., Srivastava, V., Kumar, N., Kumar S.S. and Priya, S. 2024. A multiplex DNA probe-based method for simultaneous identification of adulteration in meat samples. *Food chemistry. Molecular sciences*. 8: 100200. doi: 10.1016/j.fochms.2024.100200.
- Wilesmith J.W., Wells G.A.H., Cranwell M.P. and Ryan J.B.M. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary Record*. 123: 638–644
- Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M. and Atkinson, M.J. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The Veterinary Record*. 128: 199-203
- WOAH. 2024. Bovine spongiform encephalopathy. [Online]. Available: <https://www.woah.org/en/disease/bovine-spongiform-encephalopathy/>. Accessed Oct 8, 2024.