บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในผู้ผลิตอาหารป้อนเข้าสู่ตลาดโลกมาเป็นเวลานาน ทำรายได้ให้กับประเทศปีละมากกว่าแสนล้านบาท และดูเหมือนว่าแนวโน้มทางการตลาดจะมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอีกในอนาคต เนื่องจากความต้องการบริโภคอาหารของประชากรโลกเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หนึ่งในผลิตภัณฑ์อาหารของไทยที่มีความสำคัญมาก คือ "อาหารฮาลาล" (Halal Food) ซึ่งเป็นอาหารที่ผลิตขึ้นสำหรับมุสลิมโดยเฉพาะ เนื่องจากประชากรมุสลิมทั่วโลกมีจำนวนถึง 2,000 ล้านคน ดังนั้น อาหารฮาลาลจึงเป็นช่องทางการตลาด (Market Channel) ที่สำคัญ ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตอาหารสำคัญของโลก ประกอบกับนโยบายภาครัฐ มุ่งหมายที่จะผลักดัน และส่งเสริมอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลเพื่อการส่งออก และได้แปลงนโยบายสู่การปฏิบัติอย่างจริงจัง ทั้งในด้านการพัฒนาวัตถุดิบ การส่งเสริมผู้ประกอบการ การแสวงหาตลาดและการพัฒนากลไกการรับรองมาตรฐานฮาลาลให้เป็นที่น่าเชื่อถือยอมรับของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากกระบวนการผลิตอาหารในอุตสาหกรรมยุคใหม่มีความซับซ้อนมากขึ้น มีการใช้วัตถุดิบและสารเคมีจำนวนมาก แม้ภาคอุตสาหกรรมจะได้กำหนดมาตรฐาน GMP HACCP และ CODEX ไว้เพื่อให้ผู้บริโภคปลอดภัยจากอันตรายต่างๆ แต่เป็นอันตรายในเชิงกายภาพ ชีวภาพและเคมีเท่านั้น ในขณะที่อันตรายจากหะรอมและนะยิส (สิ่งสกปรก) ตามหลักการศาสนาอิสลามยังอาจเกิดขึ้นได้ จึงจำเป็นที่จะต้องมีระบบการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานอาหารฮาลาลให้เป็นที่น่าเชื่อถือ เพื่อเป็นการปกป้องสิทธิ และเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค การตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้วิธีการทางวิทยาศาสตร์จึงมีความสำคัญอย่างมาก พัฒนาการในการตรวจวิเคราะห์อันหนึ่งคือการตรวจหาเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งสามารถตรวจวัดได้จากโปรตีนหรือดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสัตว์ ซึ่งมีความจำเพาะสูง แต่เทคนิคทางโปรตีนยังมีข้อเสียเนื่องจากโปรตีนถูกทำลายในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร หรือผ่านความร้อน หรืออยู่ในรูปเนื้อผสม ทำให้ยากต่อการตรวจวัดและมีความไวต่ำ การตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอจึงมีข้อดีกว่า เนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงทนกว่าโปรตีนมากและสามารถตรวจวัดได้ในเนื้อสัตว์ผสม อีกทั้งมีความไวและความจำเพาะสูง พัฒนาการการใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบ เริ่มแรกจะใช้เทคนิค DNA hybridization ซึ่งมีข้อเสีย เนื่องจากใช้เวลานานในการติดฉลาก probe ต่อมาจึงพัฒนามาใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) ซึ่งมีความรวดเร็วกว่า และใช้ปริมาณ

สารตัวอย่างตั้งต้นเพียงเล็กน้อย มีความจำเพาะ และมีความไวในการตรวจวัดสูง อีกทั้งยังสามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณโดยวิธี Real-Time PCR แต่อย่างไรก็ตาม PCR ยังเป็นวิธีที่ต้องอาศัยความชำนาญ และมีเทคนิคที่ซับซ้อนมากมาย นอกจากนั้นยังต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler) ซึ่งเป็นเครื่องมือเฉพาะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงไม่เหมาะในการตรวจวิเคราะห์ภาคสนามและห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งไม่มีเครื่องมือดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเนื้อสุกรให้ดีขึ้น โดยใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิควิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ต้องใช้เครื่อง Thermal cycler ที่มีราคาค่อนข้างแพง สะดวก สามารถใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปในการทำการวิเคราะห์ได้ เช่น ใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) หรือ กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat Block) ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น อีกทั้งยังมีความสะดวกสามารถตรวจสอบผลผลิตจาก LAMP ได้ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการวัดความขุ่นที่เกิดจาก Magnesium pyrophosphate หรือใช้เทคนิคของ SYBR Green I โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 45-60 นาที ซึ่งเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย เช่น Human Influenza A virus, Herpes Simplex virus type (HSV),*Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis* เป็นต้น พบว่ามีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือมากกว่าวิธี PCR ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้เทคนิค LAMP และยังได้ประยุกต์เทคนิค Dot blot hybridization กับเทคนิค LAMP ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรกที่มีการประยุกต์ทั้งสองเทคนิคเข้าด้วยกัน โดยนำผลผลิต LAMP มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน และตรวจสอบผลผลิตกับ probe ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอสุกร เพื่อให้การวิเคราะห์ผล LAMP มีความสะดวก รวดเร็ว ต่อการนำไปใช้ภาคสนาม และห้องปฏิบัติการทั่วไปรวมทั้งเหมาะสมกับการนำไปผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์โดยใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ LAMP-Dot Blotting
2. เพื่อศึกษาหาความไว และความจำเพาะในการตรวจดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอสุกรในเนื้อผสมระหว่างเนื้อสุกรกับเนื้อไก่ และเนื้อสุกรกับเนื้อวัวของปฏิกิริยา LAMP และ LAMP-Dot Blotting เปรียบเทียบกับวิธี PCR และ Real-Time PCR
3. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา Loop-mediated isothermal amplification โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรผสมระหว่างเนื้อสุกรกับเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ด้วยเทคนิค LAMP และ LAMP-Dot Blotting โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cytochrome b* ของสุกร และนำมาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบตาอีน ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต อุณหภูมิ เวลา และเครื่องมือให้ความร้อนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ Agarose gel electrophoresis และ SYBR Green I ตรวจสอบดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่ 0-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยวิธี LAMP และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ LAMP-Dot Blotting โดยปรับเปลี่ยนเวลาอุณหภูมิและขั้นตอนต่างๆ ในการทำไฮบริไดเซชั่นทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP และ LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์อื่น 15 ตัวอย่าง คือ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกุ้ง เนื้อหอยแครง เนื้อหอยลาย เนื้อหอยนางรม เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อสุนัข และเนื้อกบ และทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร และดีเอ็นเอสุกรในเนื้อผสม ระหว่างเนื้อสุกรกับเนื้อไก่ และ เนื้อสุกรกับเนื้อวัวเปรียบเทียบกับวิธี PCR และ Real-Time PCR ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์จำนวน 100 ตัวอย่าง เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Real-Time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold Standard) ในการศึกษาครั้งนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำวิธีการที่พัฒนาได้ไปใช้ในการตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลได้
2. สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบกับเนื้อสัตว์อื่นๆ ได้
3. สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในอาหารภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการทั่วไปได้