ผลของการเสริม *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Escherichia coli* F4

นางสาวหฤทัย สายัณห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* ON GROWTH PERFORMANCE, DIARRHEA INCIDENCE, FECAL AND INTESTINAL BACTERIAL COUNTS, INTESTINAL MORPHOLOGY AND IMMUNE RESPONSES OF SUCKLING PIGS CHALLENGED WITH *ESCHERICHIA COLI* F4

Miss Harutai Sayan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Animal Nutrition
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเสริม *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Escherichia coli* F4
โดย	นางสาวหฤทัย สายัณห์
สาขาวิชา	อาหารสัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ สพ.ญ. ดร. อนงค์นาฏ อัศวชีพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.กฤษ อังคนาพร อาจารย์ น.สพ. ดร. พรชลิต อัศวชีพ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ น.สพ. สมชาย จันทร์ผ่องแสง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ สพ.ญ. ดร. อนงค์นาฏ อัศวชีพ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.กฤษ อังคนาพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ น.สพ. ดร. พรชลิต อัศวชีพ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.จักรกริศน์ เนื่องจำนงค์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์ดุสิต เลาหสินณรงค์)

หฤทัย สายัณห์ : ผลของการเสริม *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Escherichia coli* F4 (EFFECT OF *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* ON GROWTH PERFORMANCE, DIARRHEA INCIDENCE, FECAL AND INTESTINAL BACTERIAL COUNTS, INTESTINAL MORPHOLOGY AND IMMUNE RESPONSES OF SUCKLING PIGS CHALLENGED WITH *ESCHERICHIA COLI* F4) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. สพ.ญ. ดร. อนงค์นาฏ อัศวชีพ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. น.สพ. ดร.กฤษ อังคนาพร, อ. น.สพ. ดร. พรชลิต อัศวชีพ, 74 หน้า.

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Escherichia coli* F4 โดยทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนมอายุ 1 วัน จำนวน 18 ครอก ทำการสุ่มแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) จำนวน 10 ครอก และกลุ่มที่ 2 (กลุ่มทดลอง) จำนวน 8 ครอก ลูกสุกรในกลุ่มทดลองจะได้รับการป้อน *L. salivarius* ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วันติดต่อกัน วันที่ 24 ของการทดลอง ทำการสุ่มลูกสุกร (กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง) ครอกละ 1 ตัว เพื่อป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml และในวันที่ 29 ของการทดลอง ทำการการุณยฆาตลูกสุกรที่ป้อนเชื้อ *E. coli* F4 เก็บตัวอย่างของเหลวในลำไส้และเนื้อเยื่อลำไส้เพื่อวัดค่าทางสัณฐานวิทยา และพารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ ค่า pH ของของเหลวในลำไส้ และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอในเยื่อเมือกของลำไส้

ผลการศึกษา พบว่า ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักตัว น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทั้งหมดดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการท้องเสียพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่มีแนวโน้มที่จะมีคะแนนการท้องเสียลดลงในช่วงวันที่ 25-29 ของการทดลอง ($p=0.065$) ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระพบว่าในวันที่ 10 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีปริมาณของแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) มีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลัสต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลัสต่อปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดในอุจจาระสูงขึ้นเช่นกัน ในส่วนของเหลวในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้น เจจูนัมส่วนท้าย และอิเลียม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) แต่ปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดและปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลัสทั้งหมดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ผลทางสัณฐานวิทยาของลำไส้พบว่าความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้น และเจจูนัมส่วนท้าย และอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมของกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่า pH ของของเหลวในลำไส้ พบว่า ค่า pH ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันในลำไส้เล็กส่วนอื่นๆ และความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอในเยื่อเมือกของลำไส้ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งสองกลุ่มทดลอง ($p>0.05$) ผลการทดลองสรุปได้ว่า การเสริม *L. salivarius* สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโต มีแนวโน้มในการลดความรุนแรงของการท้องเสีย มีปริมาณของแบคทีเรียแลคโตบาซิลัสในอุจจาระเพิ่มขึ้น มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้เพิ่มขึ้น และสามารถปรับปรุงสัณฐานวิทยาของลำไส้ได้

ภาควิชา สัตวบาล
สาขาวิชา อาหารสัตว์
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5675325331 : MAJOR ANIMAL NUTRITION
KEYWORDS: DIARRHEA INCIDENCE, ESCHERICHIA COLI F4, FECAL MICROORGANISM, GROWTH PERFORMANCE, IMMUNE RESPONSE, INTESTINAL MORPHOLOGY, LACTOBACILLUS SALIVARIUS, SUCKLING PIG

HARUTAI SAYAN: EFFECT OF *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* ON GROWTH PERFORMANCE, DIARRHEA INCIDENCE, FECAL AND INTESTINAL BACTERIAL COUNTS, INTESTINAL MORPHOLOGY AND IMMUNE RESPONSES OF SUCKLING PIGS CHALLENGED WITH *ESCHERICHIA COLI* F4. ADVISOR: ANONGNART ASSAVACHEEP, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KRIS ANGKANAPORN, Ph.D., PORNCHALIT ASSAVACHEEP, Ph.D., 74 pp.

The objective of this study was to examine the effect of *Lactobacillus salivarius* on growth performance, diarrhea incidence, fecal and intestinal bacterial counts, intestinal morphology and immune responses of suckling pigs challenged with *Escherichia coli* F4. Two groups of 1 day old suckling pig from 18 multiparous sows were control group (n=10) and treatment group (n=8). Pigs in treatment group were orally administered with 5 ml. of *L. salivarius* 10^9 cfu/ml while piglets in control groups received equal volume of phosphate buffer saline for 10 consecutive days. On day 24, one pig per replicate (both groups) was orally administered with *E.coli* F4 10^8 cfu/ml, on day 29, they were euthanized with sodium pentobabital solution for further intestinal morphology analysis. In addition, growth performance, diarrhea incidence, fecal and intestinal bacterial counts and the concentration of immunoglobulin A (IgA) in intestinal mucosa were determined.

The result showed that average daily gain, body weight and weight gain of piglets in the treatment group were improved ($p<0.05$), tended to have lower fecal score on day 25-29 ($p=0.065$). On day 10 of experiment, treatment group had increased total lactobacillus count in feces ($p<0.01$) and tended to increase total lactobacillus count to total bacteria count ratio and tended to increase total lactobacillus count to total coliform count ratio. Moreover, total bacteria count in duodenum, proximal jejunal, distal jejunal and ileal contents in treatment group were increased ($p<0.05$) but no significant difference in total coliform count and total lactobacillus count ($p>0.05$). Villi height and villi/crypt ratio in duodenum, proximal jejunum and distal jejunum from treatment group were increased ($p<0.05$). The pH of duodenum content in treatment group was significantly decreased ($p<0.05$), but no significant difference was found in other parts of small intestine. The concentrations of IgA in intestinal mucosa were not different ($p>0.05$) between groups. In conclusion, *L. salivarius* supplementation improved growth performance, tended to reduce the severity of diarrhea in piglet, increased total lactobacillus count in feces and total bacteria count in intestinal contents and improved intestinal morphology of piglets.

Department:	Animal Husbandry	Student's Signature	.....
Field of Study:	Animal Nutrition	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2015	Co-Advisor's Signature	.....
		Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ.สพ.ญ.ดร.อนงค์นาฏ อัศวชีพ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำด้านการวิจัย จัดหาทุนสนับสนุนการวิจัย การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ข้อมูล แก้ไขและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จและสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.น.สพ.ดร.พรชลิต อัศวชีพ และ รศ.น.สพ.ดร.กฤษ อังคนาพร ที่ได้ให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหาในการวิจัย การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การจัดหาทุนสนับสนุนการวิจัย และคำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณหน่วยงานและผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ให้ความอนุเคราะห์ และช่วยเหลือให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จได้

1) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้ชื่อทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

2) บัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ร่วมให้ทุนสนับสนุน

3) โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ.นครปฐม

4) ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ทางเคมี

5) หน่วยชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ทางเคมี

6) คุณสุกุมา สามงามนิ่ม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการวิเคราะห์ทางชีววิทยา

7) คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำช่วยเหลือในการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าอย่างดียิ่งตลอดมา ขอบคุณเพื่อนๆ และรุ่นพี่ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือด้วยความเต็มใจ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือจนทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง 9

สารบัญภาพ 10

บทที่ 1 บทนำ 11

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

สัณฐานวิทยาของลำไส้ในลูกสุกรดูดนม 13

แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร 15

ปัญหาท้องเสียในลูกสุกรดูดนม 16

สารเสริมชีวนะ (Probiotic) 17

Lactobacillus salivarius 18

กลไกการทำงานของสารเสริมชีวนะ 19

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค 19

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อสุขภาพของลำไส้ 20

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหาร 21

การศึกษาการใช้สารเสริมชีวนะแลคโตบาซิลัสในลูกสุกร 22

การศึกษาการใช้ *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร 23

Conceptual Framework 25

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 26

สัตว์ทดลองและการจัดการ 26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

กลุ่มการทดลอง 26
แบบแผนการทดลอง 27
การเก็บข้อมูล 28
การตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 30
การตรวจตัวอย่างทางจุลชีววิทยา 33
การตรวจตัวอย่างทางจุลกายวิภาค 34
การตรวจวัดความเข้มข้น IgA ด้วยวิธี ELISA 34
การวิเคราะห์ทางสถิติ 35
บทที่ 4 ผลการทดลอง 36
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 53
ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต 53
ค่า pH ของของเหลวในลำไส้ 54
อัตราการท้องเสีย 55
ปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระ 56
ปริมาณของแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ 57
สัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกร 58
ความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกร 59
สรุปผลการทดลอง 61
รายการอ้างอิง 62
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 74

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 สัณฐานวิทยาของลำไส้ลูกสุกรในช่วงอายุที่แตกต่างกัน 15

ตารางที่ 2 ปริมาณของอิมมูโนโกลบูลิน (mg/ml) ในเลือด นมน้ำเหลือง น้ำนม และสารเมือกในลำไส้ของลูกสุกร 22

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารเลียรางของลูกสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก 15 กิโลกรัม 39

ตารางที่ 4 ผลของ *L. salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 40

ตารางที่ 5 ผลของ *L. salivarius* ต่อน้ำหนักตัวของลูกสุกรก่อนและหลังป้อนเชื้อ E.coli F4 41

ตารางที่ 6 ผลของ *L. salivarius* ต่อระดับ pH ของของเหลวในลำไส้เล็กของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 42

ตารางที่ 7 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราการท้องเสียและคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 43

ตารางที่ 8 ผลของ *L. salivarius* ต่อจำนวนวันที่ท้องเสียของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 44

ตารางที่ 9 ผลของ *L. salivarius* ต่อปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml) 45

ตารางที่ 10 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml) 46

ตารางที่ 11 ผลของ *L. salivarius* ต่อปริมาณของแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml) 47

ตารางที่ 12 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ (Contents) ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml) 48

ตารางที่ 13 ผลของ *L. salivarius* ต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli F4* 49

ตารางที่ 14 ผลของ *L. salivarius* ต่อความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (ng/ml) ในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli F4* 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 การเสริม *L. salivarius* ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร 25

ภาพที่ 2 ลักษณะอุจจาระที่ใช้ในการวัดคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรในระยะดูดนม (ภาพจากการทดลอง) 29

ภาพที่ 3 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml 50

ภาพที่ 4 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กเจจูนัมส่วนต้น (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml 50

ภาพที่ 5 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมส่วนท้าย (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml 51

ภาพที่ 6 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนอิเลียม (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli F4* (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml 51

บทที่ 1
บทนำ

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความนิยมเป็นอย่างมาก และมีการส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยได้มีการส่งออกเนื้อสุกรแช่เย็นและแช่แข็ง 2,394 ตัน และเนื้อสุกรแปรรูป 13,430 ตัน (กรมปศุสัตว์.กองแผนงาน, 2557) และปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยได้ร่วมลงนามในบันทึกความเข้าใจ ในข้อกำหนดการส่งออกเนื้อสุกรจากประเทศไทยไปยังประเทศรัสเซีย ซึ่งจะช่วยทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรมักเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีช่วงวิกฤติที่ทำให้ลูกสุกรมีอาการป่วยหรือติดเชื้อก่อโรคได้ง่าย ได้แก่ ช่วงแรกเกิด และช่วงหย่านมลูกสุกร ซึ่งในช่วงแรกเกิดจะเป็นช่วงที่ค่อนข้างมีความสำคัญ เนื่องจากลูกสุกรแรกเกิดมีกลไกการทำงานของร่างกาย และระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันเชื้อก่อโรคที่ยังไม่สมบูรณ์ ทำให้มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ง่าย เชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายจะทำให้ลูกสุกรมีอาการป่วย ส่วนใหญ่จะส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้การกินได้ของลูกสุกรลดลง ชะงักการเจริญเติบโตของร่างกาย ซึ่งจะทำให้ลูกสุกรแคระแกร็น และภายในครอกเดียวกันจะมีขนาดตัวแตกต่างกัน ซึ่งลูกสุกรที่มีขนาดเล็กจะไวต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆ หรือเป็นตัวกักเก็บโรค (Reservoir) และแพร่กระจายเชื้อโรคภายในฝูงได้ โดยเชื้อก่อโรคที่พบได้ในลูกสุกรแรกเกิดมักจะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง เช่น *Escherichia coli* (*E.coli*), *Clostridium perfringens*, Porcine epidermic diarrhea และ Rotavirus เป็นต้น (Chan et al., 2013) ซึ่งจากปัญหาที่เกิดขึ้นส่งผลทำให้เกษตรกรได้รับความเสียหายและมีต้นทุนในการเลี้ยงสุกรเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการรักษา การใช้ยาปฏิชีวนะและการเพิ่มแรงงานในการดูแลลูกสุกร แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาอาจทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อสุกร ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาในมนุษย์ได้ (Estienne et al., 2005) ในปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับมาตรฐานในการเลี้ยงสุกรและความปลอดภัยในอาหารเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องลดการใช้ยาปฏิชีวนะในกระบวนการเลี้ยงสัตว์ จึงได้มีการคิดค้นเพื่อหาแนวทางในการลดปัญหาที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงสุกร และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร เพื่อให้สุกรมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้สารทางเลือกจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ในการลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาปฏิชีวนะได้

สารเสริมชีวนะ (Probiotic) เป็นสารทางเลือกที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ สามารถเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Sanders, 2008) ลดความเครียด และช่วยปรับปรุงการใช้ประโยชน์ของสารอาหารได้ (Nicolae et al., 2010) นอกจากนี้สารเสริมชีวนะจะสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *E. coli*ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มักทำให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกรลดลง (Cho et al., 2011) ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารเสริมชีวนะซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมในทางอุตสาหกรรม เช่น *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus และ Streptococcus* เป็นต้น (Dunne et al., 2001)

Lactobacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม Lactic acid bacteria มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถผลิตกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลผ่านกระบวนการหมัก และสามารถผลิตสารอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก แบคเทอริโอซิน เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้อาจช่วยปรับค่า pH ในระบบทางเดินอาหาร ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโต และการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Ljungh and Wadstrom, 2006) โดยที่ผ่านมานั้นการศึกษาที่มีการใช้ *Lactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) ในลูกสุกรดูดนมเป็นเวลาสั้นๆ และมีการป้อนเชื้อ *E. coli* F4 เพื่อทดสอบการลดอุบัติการณ์ในการเกิดโรคนั้นยังมีผู้ศึกษาน้อยและผลการศึกษายังไม่ชัดเจน โดยเชื้อแบคทีเรีย *L. salivarius* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพาะแยกได้จากฟาร์มสุกรในประเทศไทย และได้มีการทดสอบคุณสมบัติในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ทั่วไปในฟาร์มสุกรแล้ว ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจเพื่อศึกษาแนวโน้มในการใช้ *L. salivarius* เป็นสารเสริมชีวนะ โดยการทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย ปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลูกสุกรแรกเกิดจำเป็นที่จะต้องได้รับนมน้ำเหลือง (Colostrum) จากแม่สุกร ซึ่งลูกสุกรแรกเกิดต้องการนมน้ำเหลือง 300-400 มิลลิลิตร (Lecce et al., 1964) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยจะมีการเก็บสะสมเป็นไกลโคเจนเพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิของร่างกายและใช้ในกระบวนการเผาผลาญ ช่วยกระตุ้นพัฒนาการของลำไส้ โดยในนมน้ำเหลืองจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ วัตถุแห้ง 24.5% ไขมัน 6% โปรตีน 13.8% แลกโต๊ส 3.2% เถ้า 0.7% และมีพลังงาน 150 กิโลแคลอรี่/100 มิลลิลิตร (Rooke and Bland, 2002) ซึ่งโปรตีนในนมน้ำเหลืองจะมีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) 38% แต่หลังคลอดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินในน้ำนมลดลงเหลือประมาณ 12% (Aumaitre and Seve, 1978) อิมมูโนโกลบูลินที่สำคัญที่มีการถ่ายทอดผ่านน้ำนมแม่ คือ อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) และอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) ซึ่งจะถูกดูดซึมได้ดีในช่วง 24 ชั่วโมงหลังคลอด (Rooke and Bland, 2002) และมีความสำคัญในการปกป้องลูกสุกรในช่วงแรกเกิด เนื่องจากในช่วงแรกเกิดลูกสุกรมีกลไกการป้องกันและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ของร่างกายยังไม่สมบูรณ์ อาจทำให้ร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ง่าย ซึ่งจะส่งผลทำให้ลูกสุกรมีอัตราการป่วยหรืออัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น (Ferrari et al., 2014)

ปัญหาการป่วยหรือตายในช่วงแรกเกิดถึงก่อนหย่านม เป็นปัญหาหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร เนื่องจากทำให้จำนวนลูกสุกรที่รอดชีวิตต่อครอกลดลง มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งอาการป่วยและการตายของลูกสุกรอาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น มีน้ำหนักแรกคลอดต่ำ การได้รับอาหารที่ไม่เพียงพอ อาการท้องเสียและการป่วยอื่นๆ (Ferrari et al., 2014) โดย Kilbride และคณะ (2012) รายงานว่า การตายก่อนหย่านมของลูกสุกรสามารถเกิดได้จากความไม่สมบูรณ์ของร่างกาย 2–30% การขาดอาหารหรือได้รับอาหารไม่เพียงพอ 5–20% และเกิดจากปัญหาท้องเสีย 10%

สัณฐานวิทยาของลำไส้ในลูกสุกรดูดนม

การพัฒนาของระบบทางเดินอาหารจะเกิดขึ้นตั้งแต่ลูกสุกรอยู่ในท้องของแม่สุกร แต่จะมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดในช่วงก่อนคลอดและหลังคลอด มีการเจริญของเยื่อบุผิวลำไส้ที่มีความจำเพาะในการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหาร การตอบสนองต่อต่อมไร้ท่อ และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งกระบวนการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารของลูกสุกรจะแบ่งเป็น 5 ระยะ ได้แก่

1.ระยะ Morphogenesis เป็นระยะที่มีการพัฒนาของเซลล์เพื่อเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นอวัยวะ

2.ระยะ Cytodifferentiation เป็นระยะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์และมีการพัฒนาของตัวอ่อนตั้งแต่ยังอยู่ในท้องของแม่สุกร เพื่อเตรียมเยื่อบุผิวที่ใช้ในการดูดซึมนมน้ำเหลืองและน้ำนม

3.ระยะแรกเกิดและการดูดนมในช่วงแรกหลังคลอด หลังจากลูกสุกรได้รับนมน้ำเหลืองแล้ว ร่างกายจะมีการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารอย่างรวดเร็ว เช่น ความยาวของลำไส้ ความสูงของวิลไล (Villi height) และความลึกของคริปท์ (Crypt depth) ซึ่งวิลไลจะเป็นส่วนที่นูนขึ้นมาจากผนังลำไส้จะประกอบด้วยหลอดเลือดและท่อน้ำเหลือง มีหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารต่างๆ คริปท์จะเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่ลึกลงไประหว่างวิลไล 2 วิลไล มีหน้าที่สำคัญในการสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ เยื่อบุที่เสื่อมสภาพบนวิลไล (Crosnier et al., 2006) นอกจากนี้ในช่วงแรกเกิดจนถึง 2 วันแรกหลังคลอด ลำไส้จะสามารถดูดซึมสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ดี เช่น อิมมูโนโกลบูลิน (Varley and Wiseman, 2001)

4.ระยะ Suckling period เป็นช่วงระยะดูดนมจนถึงช่วงก่อนหย่านมลูกสุกร จะเป็นช่วงที่ร่างกายมีการพัฒนาและเพิ่มการผลิตเอนไซม์ในทางเดินอาหาร โดยจะมีการพัฒนาเพิ่มการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน น้ำตาลที่มีโมเลกุลที่ซับซ้อน และเอนไซม์จากตับอ่อน (Corring et al., 1978; Sona, 2012)

5.ระยะ Weaning เป็นระยะหย่านมลูกสุกร ในระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นช่วงที่มีความสำคัญอีกช่วงหนึ่งของการเลี้ยงสุกร เนื่องจากมีการเปลี่ยนจากอาหารเหลวเป็นอาหารแข็งและเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย ซึ่งจะก่อให้เกิดความเครียดได้ จึงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารได้ (Barszcz and Skomiał, 2011; Heo et al., 2013)

ตารางที่ 1 สัณฐานวิทยาของลำไส้ลูกสุกรในช่วงอายุที่แตกต่างกัน

ตำแหน่ง		อายุลูกสุกร (วัน)			
		18	**22**	**29**	**36**
Villous height (μm)	Duodenum	435	414	344	398
	Proximal Jejunum	379	382	374	360
	Distal Jejunum	382	361	270	350
	Ileum	384	313	296	339
Crypt depth (μm)	Duodenum	248	252	289	353
	Proximal Jejunum	208	226	221	309
	Distal Jejunum	200	212	218	254
	Ileum	205	224	206	252

ที่มา: (Gu et al., 2002)

นอกจากนี้ในระบบทางเดินอาหารจะมีการหลั่งสารที่เป็นกรด เพื่อช่วยปรับสภาพแวดล้อมของลำไส้ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยอาหาร โดยค่า pH ในทางเดินอาหารของลูกสุกรในช่วงแรกเกิด เป็นดังนี้ กระเพาะอาหาร 5.2 – 5.3 ลำไส้เล็กส่วนหน้า (Anterior) 6.4 - 6.8 ลำไส้เล็กส่วนท้าย (Posterior) 6.3 – 6.7 ไส้ตัน 6.7 – 7.7 และในลำไส้ใหญ่ 6.6 – 7.2 (Maré, 2009) ค่า pH นั้นอาจจะยังไม่สามารถป้องกันหรือทำลายแบคทีเรียที่เข้าสู่ทางเดินอาหารได้ทั้งหมด เนื่องจากมีความเป็นกรดที่ค่อนข้างต่ำจึงทำให้แบคทีเรียที่เข้าสู่ทางเดินอาหารสามารถเข้ายึดเกาะกับผนังลำไส้และก่อให้เกิดโรคได้ ซึ่งการก่อโรคของแบคทีเรียก็อาจจะส่งผลกระทบที่แตกต่างกันต่อทางเดินอาหาร เช่น ทำลายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายซึ่งจะส่งผลให้มีการรบกวนกลไกในการดูดซึมสารอาหารหรือการทำงานต่างๆ ของลำไส้ได้

แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

ในลูกสุกรแรกเกิดนั้นร่างกายอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ เนื่องจากร่างกายไม่เคยสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียมาก่อน เพราะก่อนคลอดลูกสุกรจะถูกห่อหุ้มด้วยถุงน้ำคร่ำ (Fetal membrane) แต่หลังจากคลอดออกมาแล้วไม่นานลูกสุกรจะได้รับแบคทีเรียเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียอาจมีทั้งชนิดที่ก่อโรคและชนิดที่ไม่ก่อโรค ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่สะสมอยู่บนพื้นคอก ผิวหนัง เต้านม หรือช่องคลอดของแม่สุกร (Castillo, 2006) ซึ่งจะมีแบคทีเรียทั้งชนิดที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นถึง 80% ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดภายใน 3 ชั่วโมงหลังคลอด และภายใน 12 ชั่วโมงหลังคลอดจะมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย 10^9

cfu/g ซึ่งในช่วงแรกเกิดถึง 3 ชั่วโมงหลังคลอด ในอุจจาระจะมีปริมาณของแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่อยๆ ลดจำนวนลง แต่หลังจากนั้นจะมีปริมาณของแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้จะพบแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* และกลุ่ม *Streptococci* เพิ่มมากขึ้นหลังจาก 7 วันหลังคลอด ในระยะดูดนมของลูกสุกรอาจพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ประมาณ 10^7 - 10^9 cfu/g (Swords et al., 1993) ปัจจัยที่จะมีผลต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร อาจมีผลมาจากค่าความเป็นกรดด่างในลำไส้ด้วย เนื่องจากลูกสุกรในระยะดูดนมจะมีการสร้างหรือหลั่งเอนไซม์หรือสารต่างๆ ในทางเดินอาหารยังไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ในทางเดินอาหารมีความเป็นกรดต่ำไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคเข้าสู่ทางเดินอาหารได้

แบคทีเรียที่สามารถพบในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus, Streptococcus, Enterobacteria, Clostridium, Eubacteriam* และ *Bifidobacterium* มีประมาณ 10^3 – 10^5 cfu/g ในลำไส้เล็กส่วนท้าย (Ileum) จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus, Streptococcus, Enterobacteria, Clostridium, Bacillus* และ *Bacteroides* มีประมาณ 10^8 cfu/g และในลำไส้ใหญ่ (Colon) จะมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteria, Eubacteriam, Bifidobacterium, Clostridium,* และ *Ruminococcus* ประมาณ 10^{11} – 10^{12} cfu/g (Bederska-Lojewska and Pieszka, 2011)

ปัญหาท้องเสียในลูกสุกรดูดนม

การท้องเสียในลูกสุกรช่วงแรกเกิดและระยะดูดนม เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้มีอัตราการตายก่อนหย่านม และทำให้มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมต่ำ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยอาจมีสาเหตุมาจากการได้รับนมน้ำเหลืองที่ไม่เพียงพอ การจัดการฟาร์มที่ไม่ได้มาตรฐานและสาเหตุที่สำคัญ คือ การติดเชื้อก่อโรคเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร เช่น Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Transmissible gastroenteritis (TGE) virus, *Clostridium perfringens* type C, Rotavirus เป็นต้น (Chan et al., 2013) โดยอาการของโรคมักแสดงอาการอาเจียน ถ่ายเหลว การกินอาหารลดลง แสดงอาการขาดน้ำ น้ำหนักลด และตาย ซึ่งการท้องเสียของลูกสุกรแรกเกิดสามารถพบได้ตั้งแต่ลูกสุกรอายุ 0-4 วัน หรือภายใน 12 ชั่วโมงหลังคลอด โดย 50% ของอาการท้องเสียของลูกสุกรมักเกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* (Begum et al., 2014)

E.coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ไม่สร้างสปอร์ ประกอบด้วย Cell wall, Capsule, Peritrichous flagella, Pili หรือ Fimbria และมีโครงสร้างพิเศษ คือ Plasmid มีบทบาทสำคัญในการก่อโรค (Virulence factor) และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Drug

resistance) (Carvalho et al., 2015) เชื้อ *E. coli* มีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคพบมากในลำไส้ใหญ่ เมื่อสภาวะแวดล้อมในลำไส้เอื้ออำนวย เชื้อ *E. coli* จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วซึ่งอาจสร้างสารพิษและก่อโรคได้ ชนิดที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะเป็นซีโรไทป์ O141, O149 และ F4 โดยเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญที่มักก่อให้เกิดโรคท้องเสียในลูกสุกรแรกเกิด (Neonatal diarrhea) (Nataro and Kaper, 1998)

ETEC เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญ มักก่อให้เกิดโรคท้องเสียในลูกสุกรแรกเกิดและลูกสุกรที่มีการหย่านมเร็วกว่าปกติ ทำให้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น โดยเชื้อ ETEC จะมีแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ F4ab, F4ac และ F4ad (Van Zijderveld et al., 1990) เมื่อเชื้อก่อโรคเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร จะเข้าไปยึดเกาะบนผนังลำไส้โดยใช้ Fimbria (pili) ยึดเกาะกับ Receptors บริเวณ Brush border ของผนังลำไส้ ซึ่งการเข้าจับกับ Receptor ของ ETEC จะมีความจำเพาะ โดยมีรายงานว่า เชื้อ *E. coli* F4ab และ F4ac จะเข้าจับกับโมเลกุลของไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีขนาดโมเลกุล 210 และ 240 กิโลดาลตัน (kDa) (Jin and Zhao, 2000) ซึ่งเชื้อ *E. coli* F4 จะมีระยะฟักตัวประมาณ 3-4 วัน และสามารถสร้างสารพิษ Heat stable enterotoxins (STa) และ Heat labile enterotoxin (LT) สารพิษเหล่านี้จะทำให้มีการยับยั้งการดูดซึมกลับโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนในลำไส้ กระตุ้นให้มีการหลั่งของเหลวออกจากลำไส้เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้มีการสูญเสียน้ำในการขับอิเล็กโทรไลต์ส่วนเกินออกจากร่างกาย ลูกสุกรจึงแสดงอาการท้องเสียได้ (Chandler and Mynott, 1998; Zhang et al., 2006) นอกจากนี้อาการท้องเสียของลูกสุกรอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้าง และการทำงานทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ โดยยับยั้งการดูดซึมสารอาหารของวิลไลเพิ่มการขับน้ำและสารอิเล็กโทรไลต์ของเซลล์คริปท์

แนวทางในการรักษาส่วนใหญ่เกษตรกรมักจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ แม้ว่าจะให้ผลการรักษาที่ค่อนข้างรวดเร็ว แต่อาจส่งผลกระทบในภายหลังได้ เช่น ทำลายแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ทำให้มีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสุกร ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาในมนุษย์ หรือเพิ่มโอกาสในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียได้ (Estienne et al., 2005) รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียรายได้ และมีต้นทุนในการผลิตสุกรเพิ่มสูงขึ้น

สารเสริมชีวนะ (Probiotic)

สารเสริมชีวนะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมให้แก่สัตว์ เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยให้สัตว์มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (de Vrese and Schrezenmeir, 2008) ซึ่งการใช้สารเสริมชีวนะเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์ ควรมีความเข้มข้นอย่างน้อย 10^6 cfu/g (World Health

Organization, 2001) ปัจจุบันมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีการนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ เช่น *Lactobacillus* spp., *Bifidobacteria*, *Saccharomyces boulardii, Clostridium butyricum* เป็นต้น (Veizaj-Delia et al., 2010; Veerappan et al., 2012) โดยจุลินทรีย์ที่จะเป็นสารเสริมชีวนะต้องมีคุณสมบัติในการอยู่รอด และทนต่อความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหาร น้ำดี และน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ ไม่เป็นเชื้อก่อโรคหรือสร้างสารพิษ มีความเสถียรเมื่ออยู่ในลำไส้ สามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ได้ สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ หรือสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อช่วยยับยั้งการบุกรุกของเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ (Langen et al., 2009; Veerappan et al., 2012)

Lactobacillus salivarius

Lactobacillus salivarius เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน และสภาวะที่เป็นกรด มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 5.5-6.2 (Huang et al., 2006; Salih et al., 2009; Yang et al., 2015) *L. salivarius* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สุกร และสัตว์ปีก (Messaoudi et al., 2013) สามารถพบได้ในช่องปาก ลำไส้ และช่องคลอด (Shimauchi et al., 2008) อาจพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* ในการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 0.01-0.6% หรืออาจพบในอุจจาระ 10^5 - 10^8 cfu/g (Wells, 2011) โดย *L. salivarius* เป็นแบคทีเรียที่มีการใช้น้ำตาลผ่านกระบวนการหมักแบบ Homofermentative organism ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก และสามารถผลิต Lactase enzyme, Bacteriocins, Proteins หรือ Peptides ที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งจะเป็นการปรับสภาวะแวดล้อมในลำไส้ ให้มีความเป็นกรดซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Neville and O'Toole, 2010) *L. salivarius* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคและทนต่อยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในโฮสต์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีเกลือสูงและในลำไส้ได้ (Vasala et al., 2005) มีการศึกษาในหนูและมนุษย์พบว่า *L. salivarius* มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดการเกิดโรคในทางเดินอาหาร ทนต่อความเป็นกรดด่าง สามารถยึดเกาะในชั้นเยื่อเมือกได้ และการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถกระตุ้นระบบน้ำเหลืองและเซลล์เดนไดรติกในการต้านการอักเสบ และลดการส่งสัญญาณในการกระตุ้นการอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคได้ (Neville and O'Toole, 2010) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า *L. salivarius* K4 สามารถเจริญเติบโตในสภาวะความเป็นกรดที่ pH 3.0 สามารถเจริญเติบโตได้ 7.23 cfu/ml และที่ pH 3.5 เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตได้ 7.63 cfu/ml และเชื้อ *L. salivarius* K4 สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษามนุษย์และสัตว์ได้ 18 ชนิด เช่น Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Streptomycin เป็นต้น ซึ่งการดื้อต่อ

ยาปฏิชีวนะของ *L. salivarius* K4 อาจเกิดจากการที่เชื้อมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือเชื้อมีการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะได้ (คมแขและคณะ, 2553)

กลไกการทำงานของสารเสริมชีวนะ

สารเสริมชีวนะมีกลไกการทำงานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ที่เข้าสู่ทางเดินอาหาร โดยการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค ซึ่งจะมีความสำคัญในการป้องกันและฟื้นฟูความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ (Oelschlaeger, 2010) เช่น แบคเทอริโอซิน กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Dunne et al., 2001) แบคทีเรียที่เป็นสารเสริมชีวนะสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการเข้าจับกับสารอาหารและบนเยื่อบุผิวลำไส้ ช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่าน Innate immune system และเพิ่มการทำงานของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ในการเพิ่ม Barrier function ของลำไส้ (Vanderpool et al., 2008) นอกจากนี้สารเสริมชีวนะจะสามารถผลิตกรดบิวทิริกซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย ที่เซลล์ของลำไส้สามารถดึงไปใช้เป็นพลังงาน ช่วยในการสร้างเซลล์ทดแทน (Turnover) ของเซลล์ Enterocytes กระตุ้นการหลั่งเมือก และ Secretory IgA (sIgA) ในลำไส้ได้ (Madsen, 2001)

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ความสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ในระบบทางเดินอาหาร เป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มความสมบูรณ์ของสุขภาพสัตว์ ซึ่งสารเสริมชีวนะจะสามารถรักษาและปรับความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ได้ โดยการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้ และยับยั้งการผลิตสารพิษของเชื้อก่อโรค เช่น สารแบคเทอริโอซิน และกรดอินทรีย์ ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเสียความสมดุลและตายได้ (Vanderpool et al., 2008)

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นได้ ทนความร้อน ออกฤทธิ์ได้ทั้งแบบแคบและแบบกว้างขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่สร้างขึ้น โดยในการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพบว่า แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ โดยอาจมีการทำลายเชื้อก่อโรคได้โดยตรง หรือส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Dobson et al., 2012) แบคเทอริโอซินจะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยไปยับยั้งการสร้าง Peptidoglycan และรบกวนการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของสารโพแทสเซียมในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีการผ่านเข้าออกของสารในเซลล์มากขึ้น มีแรงดันภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์เสียความสมดุล และส่งผลให้เซลล์เสียสภาพได้ (Brotz *et al*., 1995; Diep *et al*., 2007; Zeth, 2012)

กรดอินทรีย์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย เช่น กรดแลคติกซึ่งมีค่า pK_a = 3.86, กรดฟอร์มิกมีค่า pK_a= 3.7 และกรดอะซิติกมีค่า pK_a = 4.76 (Kragl, 2005) ซึ่งจะช่วยให้ค่า pH ของลำไส้ลดต่ำลง ซึ่งกรดที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวนั้นจะมีคุณสมบัติเป็น Lipophilic สามารถซึมผ่านผนังเซลล์และมีการสะสมได้ ทำให้ค่า pH ภายในเซลล์มีความเป็นกรดมากกว่าภายนอกเซลล์ โดยกรดที่ผ่านเข้าไปในเซลล์จะไปทำลาย Electrochemical proton gradient ทำให้ระบบการขนส่ง Substrate ผิดปกติ (Ammor et al., 2006) ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ส่งผลทำให้เซลล์เสื่อมสภาพได้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ผลิตจาก Lactic acid bacteria ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะส่งผลทำให้เกิด Peroxidation ของไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ สูญเสียความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆ ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลอื่นๆ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide (O^-_2) และ Hydroxyl (OH_2) radicals ซึ่งจะสามารถทำลายดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ตายได้ (Ammor et al., 2006)

คาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนใหญ่จะผลิตจาก Lactic acid bacteria ที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการ Pentose phosphoketolase pathway มีบทบาทสำคัญในการสร้างสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic environment) ซึ่งจะไปยับยั้ง Enzymatic decarboxylations และทำให้มีการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ชั้นไขมันของเซลล์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการซึมผ่านของสาร นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ โดยระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Ammor et al., 2006)

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อสุขภาพของลำไส้

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยทั่วไปจะมีจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหาร 10^1 - 10^3 cfu/g ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมมีจุลินทรีย์ 10^4 - 10^7 cfu/g ลำไส้เล็กส่วนอิเลียมมีจุลินทรีย์ 10^{11} - 10^{12} cfu/g โดยที่บริเวณชั้นเยื่อบุลำไส้จะมีชั้นเยื่อเมือก ซึ่งจะแยกออกอย่างชัดเจนจากส่วนลูเมน โดยชั้นเยื่อเมือกจะมีความหนา ความซับซ้อน และเป็นส่วนที่มีการฝังตัวของแบคทีเรียประจำถิ่น ซึ่งมีส่วนช่วยปรับปรุงการย่อยและดูดซึมสารอาหารและการเผาผลาญอาหาร การเสริมสารเสริมชีวนะจะช่วยปรับปรุงสุขภาพของลำไส้ ควบคุมปริมาณของแบคทีเรีย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสารเสริมชีวนะจะยึดเกาะบนเยื่อบุผิว ทำให้การหลั่งสารเมือกเพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มการทำงานและการป้องกันผนังลำไส้ เพิ่มการทำงานของ Innate immunity และลดการอักเสบของลำไส้ (Collado et al., 2009) โดยในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการหลั่งเมือก ซึ่งในเมือกจะมีสารที่เกี่ยวข้อง

กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้ายึดเกาะของเชื้อก่อโรคที่เยื่อบุผิวลำไส้เรียกว่า sIgA (Herich and Levkut., 2002; Mantis *et al*., 2011)

บทบาทของสารเสริมชีวนะต่อระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหาร

โครงสร้างพื้นฐานของระบบทางเดินอาหารจะประกอบด้วยผนัง 4 ชั้น คือ ชั้นเยื่อเมือก (mucous membrane หรือ mucosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis externa) และชั้นเซโรซา (serosa membrane) ซึ่งการทำงานของลำไส้นั้น จะได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางการกินอยู่เสมอ อาจจะเป็นทั้งชนิดที่ก่อโรคและชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยถ้าเป็นชนิดที่ก่อโรคก็อาจส่งผลกระทบทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้จึงมีกลไกในการป้องกันร่างกายที่ค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งกลไกเบื้องต้นในการป้องกันของลำไส้จะมีการหลั่งสารเมือกออกมาในชั้นเยื่อเมือกของลำไส้ นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นต่างๆ ที่ช่วยในการป้องกันแบคทีเรียแปลกปลอมที่เข้าสู่ลำไส้ด้วย (Zhang et al., 2011) โดยสารเมือกจะมีการสร้างและหลั่งมาจาก Goblet cells เข้าสู่ช่องทางเดินอาหาร (Lumen) ช่วยทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านป้องกันสารที่มีโมเลกุลใหญ่ช่วยเป็นสารหล่อลื่น ช่วยป้องกันผนังลำไส้ ลดความเป็นกรดของอาหารที่มาจากกระเพาะอาหาร ช่วยในกระบวนการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ ในสารเมือกที่หลั่งมาภายในลำไส้จะมีปริมาณของ IgA สูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิดอื่น ดังตารางที่ 2

สารเสริมชีวนะจะกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหาร โดยการเข้าจับกับ Dendritic cells, Macrophages หรือ Microfold cells ซึ่งจะมีอยู่ในชั้น Epithelium และ Peyer’s patches (Jang et al., 2004) โดยจะทำหน้าที่เป็น Antigen-presenting cells (APC) กระตุ้นการทำงานของ B-Lymphocyte และ T-Lymphocyte โดย B-Lymphocyte จะมีการผลิตแอนติบอดีหลายชนิด ได้แก่ IgG IgM IgA IgE และ IgD ซึ่งในการตอบสนองต่อแบคทีเรียในทางเดินอาหารนั้น B-Lymphocyte จะผลิต IgA ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จะอยู่ในสารเมือกของร่างกาย โดยการเพิ่มการสร้าง IgA-producing cells จาก Plasma cell แล้วจึงกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงบน basal surface ของ B-Lymphocyte ให้เป็น IgA แล้วจะถูกย้ายไปยัง Mesenteric lymph node หลังจากนั้นจะไหลเวียนผ่าน Thoracic duct ไปยังแขนงหลอดลม (Bronchus) และต่อมน้ำนม (Mammary glands) ซึ่งเป็นส่วนของ Mucosal distant site ก่อนถูกหลั่งออกสู่ Mucosal sites ในรูปของ secretory IgA (sIgA) (Galdeano et al., 2007) ซึ่ง sIgA ในเยื่อเมือกจะช่วยป้องกันการเข้ายึดเกาะของเชื้อก่อโรคบนผนังลำไส้ ซึ่งการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียในลำไส้จะเป็นการกระตุ้นเพื่อการรักษาสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมและสัตว์สามารถดำรงชีวิตได้

ตารางที่ 2 ปริมาณของอิมมูโนโกลบูลิน (mg/ml) ในเลือด นมน้ำเหลือง น้ำนม และสารเมือกในลำไส้ของลูกสุกร

	IgG	IgA	IgM	IgA:IgG
เลือด	24.3	2.4	2.9	0.1
นมน้ำเหลือง (0 h)	61.8	9.1	3.2	0.16
น้ำนม	1.4	3.0	0.9	2.1
สารเมือกในลำไส้	0.2	2.6	Trace	13.0

ที่มา: (Bourne, 1973)

การศึกษาการใช้สารเสริมชีวนะแลคโตบาซิลัสในลูกสุกร

Banach และคณะ (2002) รายงานการใช้ *L. brevis* Strain 1E1 ต่อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของลูกสุกรดูดนม (อายุ 9-13 วัน) และลูกสุกรหย่านม (อายุ 19-23 วัน) โดยแบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม จำนวน 4 ครอก กลุ่มที่ได้รับ Milk replacer จำนวน 5 ครอก และกลุ่มที่ได้รับ Milk replacer ร่วมกับ *L. brevis* 1E1 จำนวน 5 ครอก โดยทำการทดลองตั้งแต่ลูกสุกรแรกเกิด พบว่า ในลูกสุกรก่อนหย่านมกลุ่มที่ได้รับ *L. brevis* 1E1 ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม มีแนวโน้มที่มีปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มลดลง และในลำไส้เล็กส่วนอิเลียมมีแนวโน้มที่มีปริมาณของเชื้อ *E.coli* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตตั้งแต่แรกเกิดจนถึงหย่านมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การเสริม *L. brevis* 1E1 ในลูกสุกรหย่านม พบว่า ปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มในลำไส้เล็กส่วนอิเลียมมีแนวโน้มลดลง ปริมาณของเชื้อ *E.coli* ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม และอิเลียมลดลง และมีแนวโน้มที่จะมีน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Konstantinov และคณะ (2008) รายงานการศึกษาการใช้ *L. sobrius* DSM 16698 ในการต่อต้านการติดเชื้อ ETEC ของลูกสุกรหย่านมอายุ 21 วัน โดยใช้ *L. sobrius* DSM 16698 ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml และในวันที่ 7 ของการทดลองมีการป้อนเชื้อ ETEC (O149 F4ac) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักมีชีวิตของลูกสุกร เพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และลดปริมาณของเชื้อ ETEC ในลำไส้เล็กส่วนอิเลียมได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Zhang และคณะ (2010) รายงานการศึกษาการใช้ *L. rhamnosus* GG ต่ออุบัติการณ์ท้องเสีย จุลินทรีย์ในอุจจาระ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรหย่านมอายุ 18 วัน โดยใช้เชื้อ *L. rhamnosus* GG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml และในวันที่ 8 ของการทดลองมีการป้อนเชื้อ ETEC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10^{9} cfu/ml โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่ม Challenged control (CCN) เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับ

เชื้อ ETEC และกลุ่ม LGG treatment (LGG) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการป้อน *L. rhamnosus* GG และเชื้อ *E.coli* จากการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG สามารถลดจำนวนลูกสุกรที่มีอาการท้องเสีย ลดจำนวนเชื้อโคลิฟอร์มและเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* ในอุจจาระได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *L. rhamnosus* GG สามารถกระตุ้นการหลั่ง sIgA ในเยื่อเมือกลำไส้ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CCN

Gebert และคณะ (2011) รายงานการศึกษาการใช้ *L. brevis* strain 1E1 ร่วมกับการเสริมนมในลูกสุกร การศึกษานี้ใช้ลูกสุกรแรกเกิดจำนวน 14 ครอก โดยแบ่งสุกรเป็น 3 กลุ่ม (ทุกกลุ่มจะได้รับน้ำนมจากแม่สุกร) คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเสริมนม (Milk) และกลุ่มที่มีการเสริม *L. brevis* 1E1 ความเข้มข้น 5×10^9 cfu/pig/day ร่วมกับนม (Milk+1E1) พบว่า แต่ละกลุ่มทดลองมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่มที่เสริม *L.brevis* 1E1 มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Gain:Feed) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่เสริม *L.brevis* 1E1 มีปริมาณของเชื้อ *E.coli* ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม และอิเลียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาการใช้ *Lactobacillus salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร

Peran และคณะ (2005) รายงานว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *L. salivarius* สามารถลดการอักเสบได้ โดยลดการผลิตสาร Tumor necrosis factor α (TNF-α) หรือสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบจาก Macrophages ซึ่งกลไกนี้มีบทบาทสำคัญในการลดภาวะลำไส้อักเสบ เนื่องจากโรคลำไส้อักเสบจะทำให้เกิดการหลั่ง TNF-α ที่เยื่อบุลำไส้ และภาวะลำไส้อักเสบยังส่งผลกระทบทำให้เกิดการอักเสบของวิลไลและคริปท์ทำให้สูญเสียความสามารถในการทำงานได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานทางห้องปฏิบัติการ พบว่า *L. salivarius* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ปีก สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella enteritidis* และเชื้อ *E. coli* ในการเข้ายึดเกาะที่ผนังลำไส้เล็ก และสามารถทนต่อเกลือน้ำดี และความเป็นกรดสูง (pH 3) ได้ (Murry et al., 2006) และ *L. salivarius* สามารถลดการอักเสบของลำไส้ โดยลดการหลั่งสาร TNF-α ในลำไส้ และลดการหลั่งไซโตไคน์ IL-12 ซึ่ง TNF-α จะทำหน้าที่ในการดึงเซลล์เม็ดเลือดขาว เข้าสู่ลำไส้มากขึ้นก่อให้เกิดอาการอักเสบของลำไส้ได้ นอกจากนี้ *L. salivarius* ช่วยเพิ่มสารไซโตไคน์ IL-10 ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokine) ทำให้ช่วยลดการอักเสบของลำไส้ได้ (Peran et al., 2005)

Zhang และคณะ (2011) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อ *L. salivarius* ต่อระบบภูมิคุ้มกันในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกรแรกเกิด โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ป้อนเชื้อ *L. salivarius* ความเข้มข้น 5×10^9 cfu/ml พบว่า ปริมาณของเชื้อ *Bifidobacterium* ในอุจจาระเพิ่มขึ้น เพิ่มน้ำหนักตัว และเพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่ม

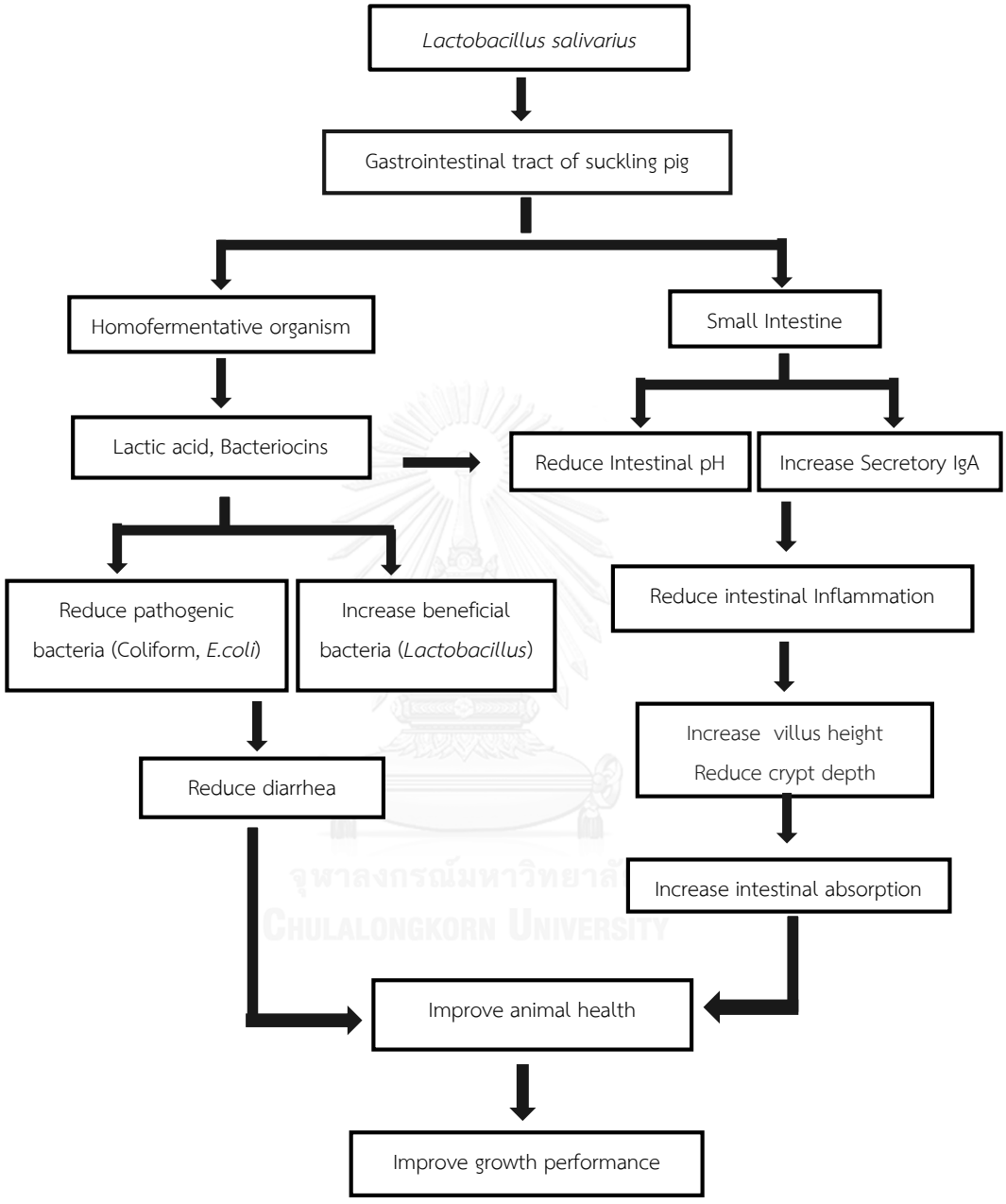
ที่ป้อนเชื้อ *L. salivarius* มีปริมาณของ *Intraepithelial* lymphocytes (IEL) ซึ่งเป็นหนึ่งในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อบุผนังลำไส้ มีส่วนในการพัฒนาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมและอิเลียมเพิ่มสูงขึ้น ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมและอิเลียมมีปริมาณของ Toll-like receptor 2 (TLR-2) เพิ่มสูงขึ้น และพลาสม่าเซลล์ที่ล้อมรอบนิวเคลียสซึ่งทำหน้าที่ผลิต IgA ในส่วนดูโอดีนัมและอิเลียมเพิ่มสูงขึ้น

Rondón และคณะ (2013) รายงานการศึกษาการใช้ *L. salivarius* C 65 ต่อสุขภาพของลูกสุกรแรกเกิดถึงอายุ 35 วัน โดยการผสม *L. salivarius* C 65 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml พบว่า สามารถลดอุบัติการณ์ท้องเสีย และที่อายุ 5 สัปดาห์สามารถเพิ่มน้ำหนักมีชีวิตของลูกสุกรได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Deng และคณะ (2013) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* RJGP16 และเชื้อ *L. salivarius* B1 ต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในเยื่อเมือกลำไส้ของสุกรแรกเกิด โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่ม *Bacillus subtilis* RJGP16 กลุ่ม *L. salivarius* B1 และกลุ่มที่ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* RJGP16 ร่วมกับเชื้อ *L. salivarius* B1พบว่า ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และ อิเลียมของกลุ่มที่เสริมสารเสริมชีวนะทั้ง 3 กลุ่ม มีระดับของ TLR-2 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่เสริม *L. salivarius* B1 และกลุ่มที่เสริม *Bacillus subtilis* RJGP16 ร่วมกับ *L. salivarius* B1 มีจำนวนของ IgA producing cell เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ทำให้นำไปสู่แนวความคิดในการศึกษาผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร ดังแผนภาพที่ 1 ได้แก่ เมื่อเชื้อแบคทีเรีย *L. salivarius* เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของลูกสุกร จะมีการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักผ่านวิถีไกลโคไลซีส เรียกว่า Homofermentative organism ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ เช่น แบคเทอริโอซิน กรดไขมันสายสั้น เป็นต้น นอกจากนี้ *L. salivarius* ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของร่างกายได้ นอกจากนี้กรดอินทรีย์จะช่วยในการปรับสภาวะแวดล้อมภายในลำไส้ให้มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค และแบคเทอริโอซินสามารถรบกวนหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์เชื้อก่อโรค ทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคเสื่อมสภาพได้ เมื่อสามารถลดการติดเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้จะทำให้ลดอาการท้องเสียและการอักเสบของลำไส้ ซึ่งจะช่วยให้กลไกการดูดซึมสารอาหารต่างๆ ของลำไส้ดีขึ้น ลูกสุกรก็จะมีสุขภาพ และมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น

Conceptual Framework



ภาพที่ 1 การเสริม L. salivarius ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองในครั้งนี้ผ่านการรับรอง จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Approval No.1431071) การทดลองนี้ทำการศึกษาในฟาร์มสุกรขนาด 1,300 แม่ ในจังหวัดราชบุรี

สัตว์ทดลองและการจัดการ

ลูกสุกรดูดนมสายพันธุ์ Duroc × Yorkshire × Landrace อายุ 1 วัน คละเพศ จากแม่สุกร (ลำดับท้องที่ 2-3) จำนวน 18 ครอก ครอกละ 10-12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 1 ครอก และกลุ่มที่ 2 มีจำนวน 8 ซ้ำๆละ 1 ครอก โดยจะมีการให้อาหารเลียรางเมื่อลูกสุกรอายุ 10-29 วัน ลูกสุกรได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง (*ad libitum*) ทำการหย่านมลูกสุกรที่อายุ 24-26 วัน

อาหารที่ใช้สำหรับลูกสุกรเป็นอาหารทางการค้า ซึ่งจะเป็นอาหารสุกรนม (Creep and Weaner Feed) มีคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ดังนี้ โปรตีนไม่น้อยกว่า 20% ไขมันไม่น้อยกว่า 4% กากใยไม่มากกว่า 3% และความชื้นไม่มากกว่า 13% โดยวัตถุดิบที่ใช้เป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ประกอบด้วยปลาป่น หางนมผงและหรือหางเนยผงและหรือนมผงขาดมันเนย กากถั่วเหลืองและหรือถั่วเหลืองอบ ข้าวโพดป่นและหรือปลายข้าว รำละเอียดและหรือรำสกัดน้ำมัน ไขมันสัตว์และหรือน้ำมันพืช แคลเซียมคาร์บอเนตและหรือไดแคลเซียมฟอสเฟตและหรือโมโนแคลเซียมฟอสเฟต เกลือ วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์

กลุ่มการทดลอง

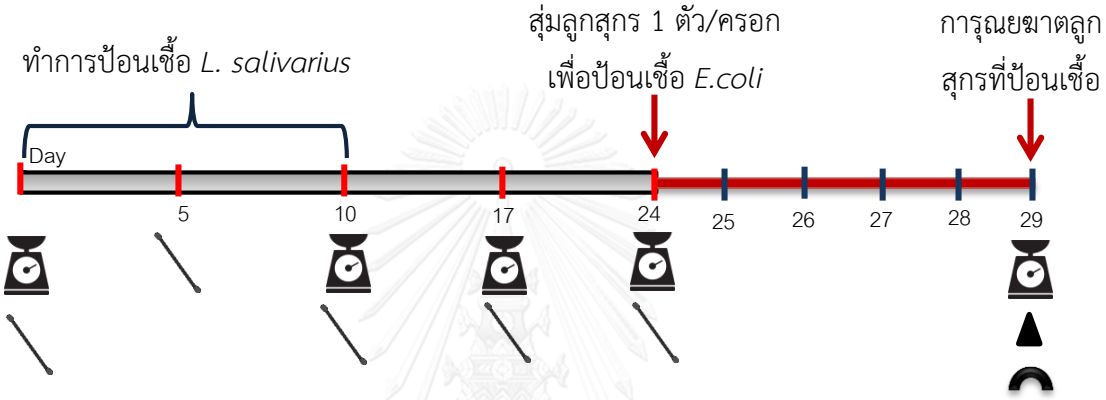
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับการป้อนสารละลาย Phosphate buffer saline solution (PBS) เป็นเวลา 10 วัน ติดต่อกัน โดยในวันที่ 1-3 ทำการป้อนปริมาตร 2 มล./ตัว/วัน และวันที่ 4-10 ทำการป้อนปริมาตร 5 มล./ตัว/วัน

กลุ่มที่ 2 ทำการป้อน *L. salivarius* ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml เป็นเวลา 10 วัน ติดต่อกัน โดยในวันที่ 1-3 ทำการป้อนเชื้อปริมาตร 2 มล./ตัว/วัน และวันที่ 4-10 ทำการป้อนเชื้อปริมาตร 5 มล./ตัว/วัน โดยเริ่มป้อนเชื้อ *L. salivarius* ภายใน 24 ชม. หลังคลอด

หลังจากหย่านมลูกสุกรแล้ว จึงทำการสุ่มลูกสุกรจากทั้ง 2 กลุ่มทดลอง ครอกละ 1 ตัว เพื่อทำการป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml. ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง ตามวิธีของ Zhang และคณะ (2010) โดยลูกสุกรที่ป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ของแต่ละกลุ่มทดลองจะถูกนำมา

เลี้ยงในคอกเดียวกัน จากนั้นในวันที่ 5 หลังจากการป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ทำการการุณยฆาตลูกสุกร โดยใช้สาร Sodium Pentobarbital ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและของเหลวในลำไส้ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ และวัดค่า pH ของของเหลวในลำไส้

แบบแผนการทดลอง



หมายเหตุ วันที่ 24 จะมีการหย่านมลูกสุกร แล้วทำการสุ่มลูกสุกร 1 ตัว/ครอก เพื่อทำการป้อนเชื้อ *E. coli* F4 และทำการการุณยฆาตในวันที่ 29 ของการทดลอง

หมายถึง การชั่งน้ำหนัก

หมายถึง การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

หมายถึง การวัดค่า pH ของของเหลวในลำไส้

หมายถึง การเก็บตัวอย่างของเหลวในลำไส้และเนื้อเยื่อลำไส้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเตรียม *L. salivarius* และ *E. coli F4*

การเตรียม *L. salivarius*

เชื้อ *L. salivarius* ที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อที่มีการแยกได้จากฟาร์มสุกร จะทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS agar) แล้วจึงนำไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยวที่เพาะแยกได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่ปรับให้มีค่า pH 5.5 นำไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมานับจำนวนเชื้อ และปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 10^9 cfu/ml (FDA, 2001)

การเตรียม *E. coli* F4

นำเชื้อ *E. coli* F4 ที่มีการเก็บรักษาไว้ (Stock) นำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยวที่เพาะแยกได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมานับจำนวนเชื้อ และปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 10^8 cfu/ml (FDA, 2001)

การเก็บข้อมูล

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต

บันทึกน้ำหนักตัวโดยจะทำการชั่งน้ำหนักลูกสุกรจำนวน 4 ครั้ง ในวันที่ 0, 10, 17 และ 24 ของการทดลอง นำมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ตามสูตรดังนี้

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Weight gain: kg) = น้ำหนักสุดท้าย (kg) – น้ำหนักเริ่มต้น (kg)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG: g/day)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวสุดท้าย (kg) - น้ำหนักเริ่มต้น (kg)} \times 1000}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

การเก็บตัวอย่างอาหาร

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเลียรางปริมาณ 500 กรัม เพื่อวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการด้วยวิธี Proximate analysis โดยวิเคราะห์หาค่าวัตถุแห้ง (Dry matter) ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีน (Crude protein) ไขมัน (Crude fat) เยื่อใย (Crude fiber) และพลังงาน (Gross energy) (Galyean, 2010; AOAC, 2012)

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระจากลูกสุกร โดยล้วงจากทวารหนัก จำนวน 2 ตัว/ครอก โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 6.00-7.00 น. เก็บตัวอย่างจำนวน 4 ครั้ง ในวันที่ 5, 10,

17 และ 24 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างอุจจาระประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในถุงเก็บตัวอย่าง ปิดปากถุง แล้วจึงนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count: TBC) ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform count: TCC) และปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด (Total lactobacillus count: TLC)

อัตราการท้องเสีย

ทำการสังเกตบริเวณหาง รูทวาร และลักษณะของมูล โดยแบ่งเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0 คือ ปกติ อุจจาระแข็ง, 1 คือ อุจจาระกึ่งแข็ง มีการคงรูปร่างได้ดี, 2 คือ อุจจาระกึ่งแข็งกึ่งเหลว และ 3 คือ อุจจาระมีลักษณะเหลวเป็นน้ำ (Robb et al., 2003) และจดบันทึกเพื่อนำไปคำนวณอัตราการท้องเสีย (Liu et al., 2010) และคะแนนการท้องเสีย (Fecal score) (Giang et al., 2010)

$$\text{อัตราการท้องเสีย (\%)} = \frac{\text{จำนวนลูกสุกรท้องเสียในแต่ละวัน} \times \text{จำนวนวันท้องเสีย}}{\text{จำนวนลูกสุกรทั้งหมด} \times \text{จำนวนวันที่เลี้ยง}} \times 100$$

$$\text{คะแนนการท้องเสีย} = \frac{\text{คะแนนรวมการท้องเสียของลูกสุกรทั้งหมด}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

Fecal score = Fecal score = Fecal score = Fecal score =

ภาพที่ 2 ลักษณะอุจจาระที่ใช้ในการวัดคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรในระยะดูดนม (ภาพจากการทดลอง)

การเก็บตัวอย่างของเหลวในลำไส้

ทำการเก็บตัวอย่างของเหลว (Contents) ในลำไส้ จากลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ Proximal jejunum และ Distal jejunum และลำไส้เล็กส่วนอิเลียม เก็บโดยการมัดเชือกด้าย 2 จุด โดยให้จุดที่มัดห่างกันประมาณ 5-10 เซนติเมตร เพื่อป้องกันของเหลวในลำไส้ไหลออกมาภายนอก แล้วจึงเก็บใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้ ได้แก่ ดูโอดีนัม เจจูนัมซึ่งแบ่งครึ่งของความยาวออกเป็น 2 ส่วน คือ Proximal jejunum และ Distal jejunum และลำไส้เล็กส่วนอิเลียม ความยาวส่วนละประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการตรึงด้วยหมุดลงบนแผ่นโฟม แล้วจึงนำไปใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10% เพื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้ไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลกายวิภาค และจุลพยาธิวิทยา ตามวิธีของ Rubio และคณะ (2010)

ทำการเก็บชิ้นเนื้อลำไส้เล็กจากลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ Proximal jejunum และ Distal jejunum โดยทำการมัดลำไส้ด้วยเชือกจำนวน 2 ตำแหน่ง โดยให้จุดที่มัดเชือกห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร เพื่อป้องกันของเหลวที่อยู่ในลำไส้ไหลออกมา จากนั้นจึงเก็บใส่ในถุงปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจวัดความเข้มข้นของ IgA ในเยื่อเมือกลำไส้ด้วยวิธี ELISA (Koma Biotech INC, 2010)

การวัด pH ของของเหลวในลำไส้

ทำการตัดลำไส้จากบริเวณเหนือกึ่งกลางลำไส้ความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร จากลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมซึ่งแบ่งครึ่งของความยาวออกเป็น 2 ส่วน คือ Proximal jejunum และ Distal jejunum และลำไส้เล็กส่วนอิเลียม ระวังไม่ให้ของเหลวในลำไส้ไหลออกมา แล้วใช้โพรบของเครื่อง pH มิเตอร์ ให้สัมผัสกับของเหลวในลำไส้แล้วอ่านผล

การตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารปริมาณ 500 กรัม นำไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการโดยประมาณ (Proximate Analysis) โดยวิเคราะห์หาค่าวัตถุแห้ง (Dry matter, DM) ความชื้น (Moisture, MC) เถ้า (Ash) ไขมัน (Ether extract, EE) โปรตีน (Crude protein, CP) เยื่อใย (Crude fiber, CF) พลังงาน (Gross Energy, GE) แคลเซียมและฟอสฟอรัส (Galyean, 2010; AOAC, 2012)

ความชื้น และวัตถุแห้ง : ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง และนำไปเข้าตู้อบแห้งอุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำถ้วยกระเบื้องใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละของความชื้นและวัตถุแห้ง

$$\text{ร้อยละของความชื้น (\%MC)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละของวัตถุแห้ง (\%DM)} = 100 - \%MC$$

เถ้า : ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ที่อบแห้งเพื่อไล่ความชื้นออกแล้วไปเผาบน Hot plate ภายในตู้ดูดควันจนหมดควัน หลังจากนั้นจึงนำถ้วยกระเบื้องที่มีตัวอย่างเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 6 ชั่วโมง โดยสังเกตจากสีของเถ้า ซึ่งเถ้าที่มีกระบวนการเผาไหม้ที่สมบูรณ์แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเทา เมื่อครบกำหนดจึงนำถ้วยกระเบื้องออกมาใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละของเถ้าทั้งหมด

$$\text{ร้อยละของเถ้าทั้งหมด (\%Ash)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังเผา} - \text{น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ไขมัน : การวิเคราะห์ไขมันในอาหารสัตว์จะใช้สารละลายอีเทอร์ (Ether) เป็นตัวสกัด หลังจากนั้นจึงนำไประเหยสารละลายอีเทอร์ออกจนหมดแล้วจะได้สาร เรียกว่า Ether extract (EE) โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารใส่ในกระดาษกรองประมาณ 1 กรัม ห่อให้มิดชิดระวังไม่ให้แตก ใส่ลงใน Thimble และเติมโซเดียมซัลไฟล์เพื่อทำการเร่งปฏิกิริยา แล้วจึงปิดด้วยสำลี จากนั้นจึงทำการตวงปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วทรงกลม นำ Thimble และ และขวดแก้วทรงกลมใส่ในเครื่องสกัดไขมัน ใช้เวลาประมาณ 2 -3 ชั่วโมง โดยสารปิโตรเลียมอีเทอร์จะได้รับความร้อนระเหยเป็นไอลอยขึ้นไป เมื่อเจอกับความเย็นก็จะเกิดการควบแน่นเป็นหยดน้ำผ่านตัวอย่าง ซึ่งปิโตรเลียมอีเทอร์ก็จะช่วยชะเอาไขมันออกจากตัวอย่างลงไปรวมอยู่กับปิโตรเลียมอีเทอร์ภายในขวดแก้วทรงกลม เมื่อครบกำหนดจึงนำขวดแก้วทรงกลมไประเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจนหมด จึงนำไปอบให้แห้ง แล้วจึงนำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาร้อยละของ Ether extract (%EE)

Chulalongkorn University

$$\text{ร้อยละของ Ether extract (\%EE)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังอบ} - \text{น้ำหนักขวดแก้วทรงกลม}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

โปรตีน : การวิเคราะห์โปรตีนจะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง โดยใช้วิธี Kjeldahl method ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในอาหาร ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีน (True protein) และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non-protein nitrogen) ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์จะเป็นโปรตีนรวม หรือโปรตีนหยาบ (Crude protein) โดยทำการชั่งตัวอย่างอาหาร 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน เติม Catalyse $CuSO_4$+K_2SO_4 และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องย่อยประมาณ 2-3 ชม. จนได้เป็นน้ำใส เมื่อครบกำหนดนำหลอดย่อยโปรตีนออกมาตั้งให้เย็น ทำการตวงกรดบอริก (Boric acid) ความเข้มข้น 4% ที่ผสม Indicator Methyl red ประมาณ 40 มิลลิลิตร ใส่ใน Erlenmeyer flask แล้วนำ Erlenmeyer flask และหลอดย่อยโปรตีนที่เย็นแล้วใส่ในเครื่องสำหรับกลั่นอัตโนมัติ โดยเครื่องจะ

เติมสารโซเดียม ไฮดรอกไซด์ประมาณ 75 มิลลิลิตร แล้วทำการกลั่นโดยแอมโมเนียจะถูกนำมาเก็บใน Erlenmeyer flask โดยจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว หลังจากนั้นนำไปไตเตรทด้วย Std. H_2SO_4 0.5 N จะทำให้ Boric acid เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูแล้วนำปริมาณของ Std. H_2SO_4 ไปคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจน

$$\text{ร้อยละของ Nitrogen} = \frac{(A-B) \times 0.014 \times N \times 100 \times 6.25}{w}$$

A = ปริมาณของสาร Std. H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาณ Std. H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรท blank (ให้แทนด้วยค่า 0)

w = น้ำหนักตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของ HCl ที่ทราบแน่นอน

เยื่อใย : การวิเคราะห์หาเยื่อใยในอาหาร ทำได้โดยการนำตัวอย่างอาหารมาย่อยด้วยกรดและด่างเจือจาง เพื่อย่อยเอาสารอินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถย่อยได้ออกไป ส่วนสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่และไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย Cellulose, Hemicellulose และ Lignin โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหาร 0.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมกรดซัลฟูริก 1.25% 200 มิลลิลิตร ที่อุ่นให้ร้อนนำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์หาเยื่อใย โดยต้มให้เดือดแล้วทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปกรอง และล้างด้วยน้ำกลั่น เอากากที่เหลือออกใส่บีกเกอร์อีกครั้ง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25% ที่อุ่นให้ร้อน นำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์หาเยื่อใย โดยต้มให้เดือดแล้วทิ้งไว้ 30 นาที นำไปกรองด้วยถ้วยกระเบื้อง และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปเข้าตู้อบให้แห้ง แล้วนำออกมาตั้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที นำมาชั่งน้ำหนักแล้วจดบันทึก นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วเข้าเตาเผา 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จดบันทึก

$$\text{ร้อยละของเยื่อใย (\%Crude fiber)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนเผา} - \text{น้ำหนักหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

แคลเซียม : ทำการชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 2.5 กรัม นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเทเถ้าที่ได้ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 10% HCl 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปต้มบน Hot plate นาน 5-10 นาที ด้วยไฟอ่อน จากนั้นจึงกรองด้วยกระดาษกรองลงในขวดรูปชมพู่ ใช้น้ำกลั่นในการชะแร่ธาตุให้ลงมาอยู่ในน้ำและแยกตะกอนออก จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปิเปตมา 50 มิลลิลิตร (Factor=5) ใส่ในบีกเกอร์ แล้วหยดสารดังนี้ Methyl red 2 หยด 1:1 NH_4OH หยดจนเป็นสีเหลือง และหยด 1:3 HCl จนเป็นสีชมพู

แล้วจึงนำไปต้มอีกครั้ง เมื่อเริ่มอุ่นจึงเติม 4.2% $(NH_2)C_2O_4$ 10 มิลลิลิตร และปรับให้เป็นสีชมพูอีกครั้งด้วย 1:3 HCl ต้มต่อไปประมาณ 10 นาที จนเริ่มเดือด แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน เมื่อครบแล้วจึงนำมากรอง แล้วล้างตะกอนด้วย 1:1000 (NH_4OH:H_2O) ครั้งละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วย้ายมากรองกับขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วเจาะกระดาษกรองให้เป็นรูแล้วฉีดด้วยน้ำกลั่นชะตะกอนลงไป ปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 75-100 มิลลิลิตร เติมกรด H_2SO_4 2.5 มิลลิลิตร เขย่าจนตะกอนละลายหมด นำไปต้มโดยนับเวลาจากเวลาที่เริ่มเดือด 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงไตรเตรทด้วย 0.05 N $KMnO_4$ จนได้เป็นสีชมพูระเรื่อ และคำนวณตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์แคลเซียม} = \frac{\text{ปริมาตรของ 0.05 N } KMnO_4 \times 0.05 \times \text{Factor} \times 100 \times 0.02004}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ฟอสฟอรัส : ทำการชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 2.5 กรัม นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเทเถ้าที่ได้ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 10% HCl 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปต้มบน Hot plate นาน 5-10 นาที ด้วยไฟอ่อน จากนั้นจึงกรองด้วยกระดาษกรองลงในขวดรูปชมพู่ ใช้น้ำกลั่นในการชะแร่ธาตุให้ลงมาอยู่ในน้ำและแยกตะกอนออก จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร และเติม Molybdovanadate 20 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

การตรวจตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างอุจจาระน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ละลายใน PBS ทำการเจือจาง (10-fold dilution) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างในแต่ละ dilution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อและเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ทำการหมุนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกระจายออก และตั้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำเข้าบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นจึงทำการนับตัวอย่าง โดยเลือกนับจากความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นชัดเจนตั้งแต่ 15-150 โคโลนี (FDA, 2001)

การตรวจนับปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างอุจาระน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ละลายใน PBS ทำการเจือจาง (10-fold dilution) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างในแต่ละ dilution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile agar (VRB) เทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างไว้ หลังจากนั้นจึงหมุนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกระจายออก ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว หลังจากนั้นจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อ VRB ทับอีกชั้นหนึ่ง เพื่อแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อน เนื่องจากเชื้อ

แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้ บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นจึงทำการนับตัวอย่าง โดยเลือกนับจากความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นชัดเจนตั้งแต่ 15-150 โคโลนี (FDA, 2001)

การตรวจนับปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างอุจจาระน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ละลายใน PBS ทำการเจือจาง (10-fold dilution) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างในแต่ละ dilution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างไว้ ปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงหมุนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกระจายออกทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง ตามวิธีของ Savino และคณะ (2005) จากนั้นจึงทำการนับตัวอย่าง โดยเลือกนับจากความเข้มข้นที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นชัดเจนตั้งแต่ 15-150 โคโลนี (FDA, 2001)

การตรวจตัวอย่างทางจุลกายวิภาค

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้ที่ผ่านการแช่ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% ทำการตัดชิ้นเนื้อมีความหนา 6 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง Microtome จากนั้นวางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Tsirtsikos และคณะ (2012) เมื่อย้อมเสร็จแล้วจึงนำแผ่น coverslip มาปิดทับเนื้อเยื่อที่ย้อมไว้บนแผ่นสไลด์แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

การตรวจวัดสัณฐานวิทยาของลำไส้ ทำการถ่ายภาพตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้กล้องดิจิตอล Canon EOS 550D (8 ภาพ/ตัวอย่าง) ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง นำภาพที่ได้มาวัดความสูงของวิลไล (Villus height, VH) และความลึกของคริปท์ (Crypt depth, CD) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Isolution lite ซึ่งในแต่ละภาพทำการวัดจำนวน 5 จุด จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของ Villi : Crypt ratio (VH:CD)

การตรวจวัดความเข้มข้น IgA ด้วยวิธี ELISA

ทำการขูดตัวอย่างเยื่อเมือกจากผนังลำไส้ ใส่ลงใน pink-ONE Assay Dilution ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 8000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใส หลังจากนั้นจึงนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ Pig IgA ELISA Kit, pink-ONE (Koma Biotech INC, 2010) ตามวิธีการดังนี้ ทำการล้างเพลทโดยใช้ Washing solution จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างที่ทำการปั่นแยกส่วนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงทำการล้างด้วย Washing solution จำนวน 4 ครั้ง ใส่สารละลาย Detection antibody 100 ไมโครลิตร ทำการปิดป้องกันแสงและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. แล้วทำการล้าง

เพลทด้วย Washing solution จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นใส่สารละลาย pink-ONE TMB color reagent บ่มที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 5 – 15 นาที โดยสังเกตการเปลี่ยนสี จากนั้นจึงนำไปอ่านที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดสอบโดยใช้ t-test สำหรับข้อมูลด้านประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการท้องเสีย จำนวนวันที่ท้องเสีย และจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสีย นำข้อมูลจากลูกสุกร 1 ครอก/ซ้ำ ข้อมูลปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระ นำข้อมูลจากลูกสุกรจำนวน 2 ตัว/ซ้ำ ข้อมูลปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ ค่า pH ของของเหลวในลำไส้ สัณฐานวิทยาของลำไส้ และการตรวจวัดความเข้มข้นของ IgA ในผนังลำไส้ นำข้อมูลจากลูกสุกร 1 ตัว/ซ้ำ คำนวณสถิติโดยใช้ Unpaired t-test และข้อมูลในด้านน้ำหนักตัวของลูกสุกรก่อนและหลังป้อนเชื้อ *E. coli* F4 นำข้อมูลจากลูกสุกร 1 ตัว/ซ้ำ และคำนวณสถิติโดยใช้ Paired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลอง กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P<0.05$ (SAS Institute Inc, 2002)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารเลียรางของลูกสุกร

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทางการค้า สำหรับลูกสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก 15 กิโลกรม ดังแสดงในตารางที่ 3

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต

ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรในระยะดูดนม แสดงในตารางที่ 4 พบว่าลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่อายุ 24 วันมีน้ำหนักตัวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Weight gain) ของลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

น้ำหนักของลูกสุกรหลังป้อนเชื้อ *E. coli* F4 พบว่า กลุ่มควบคุมมีน้ำหนักตัวของลูกสุกรลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) แสดงในตารางที่ 5

ค่าความเป็นกรด - ด่างของของเหลวในลำไส้เล็ก

ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อระดับ pH ของของเหลวในลำไส้ของลูกสุกรในระยะดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E .coli* F4 พบว่าลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีระดับของ pH ของของเหลวในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างของค่า pH ในลำไส้เล็กส่วนอื่น แสดงในตารางที่ 6

อัตราการท้องเสีย

ตารางที่ 7 แสดงผลของการเสริม *L. salivarius* ต่ออัตราการท้องเสียของลูกสุกรในระยะดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 พบว่า อัตราการท้องเสีย และคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรในช่วงวันที่ 1-24 ของการทดลอง ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ในช่วงวันที่ 25-29 ของการทดลอง พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีแนวโน้มที่จะมีคะแนนการท้องเสียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.065$)

ในช่วงวันที่ 1-24 ของการทดลองพบว่ากลุ่มที่เสริม *L. salivarius* มีจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสียลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างในด้านจำนวนวันที่ท้องเสียของลูกสุกรในช่วงวันที่ 1-24 และวันที่ 25-29 ของการทดลอง ดังตารางที่ 8

ปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระ

ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรในระยะดูดนม แสดงในตารางที่ 9 พบว่า ลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในวันที่ 10 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.01$) และวันที่ 24 กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.078$) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดในลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่ม

ตารางที่ 10 แสดงผลของการเสริม *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรในระยะดูดนม พบว่า ในวันที่ 10 ของการทดลอง กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีแนวโน้มที่จะมี อัตราส่วนของปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (TLC:TBC ratio) เพิ่มขึ้น ($p=0.073$) และมีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดต่อปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมด (TLC:TCC ratio) เพิ่มขึ้นเช่นกัน ($p=0.071$) แต่ไม่พบความแตกต่างในช่วงอื่นๆ

ปริมาณของแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ (Content)

ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ของลูกสุกร ในระยะดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 พบว่า ลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีจำนวนปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมส่วนต้น ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมส่วนท้าย และลำไส้เล็กส่วนอิเลียมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตารางที่ 11 และผลของการเสริม *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 ดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สัณฐานวิทยาของลำไส้

ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 ดังตารางที่ 13 พบว่า ลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้น และเจจูนัมส่วนท้ายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมส่วนปลายและอิเลียม มีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.068$, $p=0.077$ ตามลำดับ)

ความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) ในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกร

ตารางที่ 14 แสดงผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) ในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 พบว่า ทั้งสองกลุ่มทดลองมีความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) ในเยื่อเมือกลำไส้เล็กไม่แตกต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารเลียรางของลูกสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก 15 กิโลกรัม

สารอาหาร	ปริมาณโภชนะ
โปรตีน (g/kg)	198.9
ไขมัน (g/kg)	55
เยื่อใย (g/kg)	8.8
วัตถุแห้ง (g/kg)	924.5
เถ้า (g/kg)	63.3
ความชื้น (g/kg)	75.4
แคลเซียม (g/kg)	7.3
ฟอสฟอรัส (g/kg)	5.0
พลังงาน (GE, kcal/kg)[1]	3,968.7

[1] พลังงาน (Gross energy) ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Bomb Calorimeter

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 ผลของ *L. salivarius* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
อัตราการเจริญเติบโต (ADG) (ก./วัน)	162.58	191.20*	6.855	0.033
น้ำหนักเริ่มต้น (กก./ตัว)	1.59	1.59	0.016	0.911
น้ำหนักวันที่ 10 (กก./ตัว)	3.17	3.29	0.082	0.511
น้ำหนักวันที่ 17 (กก./ตัว)	4.39	4.74	0.132	0.203
น้ำหนักวันที่ 24 (กก./ตัว)	5.49	6.18*	0.166	0.033
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กก./ตัว)	3.90	4.58*	0.165	0.033

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5 ผลของ *L. salivarius* ต่อน้ำหนักตัวของลูกสุกรก่อนและหลังป้อนเชื้อ *E.coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***
น้ำหนักก่อนป้อนเชื้อ *E. coli* F4 (day 24) (กก./ตัว)	6.09	6.08
น้ำหนักหลังป้อนเชื้อ *E. coli* F4 (day 29) (กก./ตัว)	5.64**	5.75
SEM	0.172	0.233
p-value	0.005	0.057

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแนวตั้งที่ P<0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 6 ผลของ *L. salivarius* ต่อระดับ pH ของของเหลวในลำไส้เล็กของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
Duodenum	6.45	6.08*	0.076	0.012
Proximal Jejunum	6.23	6.30	0.102	0.740
Distal Jejunum	6.79	6.71	0.076	0.622
Ileum	6.88	6.84	0.049	0.669

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราการท้องเสียและคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
อัตราการท้องเสีย (%)	13.26	9.16	1.309	0.122
คะแนนการท้องเสีย[1]	0.50	0.39	0.041	0.194
คะแนนการท้องเสีย[2]	1.40	1.05	0.095	0.065

[1] คะแนนการท้องเสียของลูกสุกรในช่วงวันที่ 1-24 ของการทดลอง

[2] คะแนนการท้องเสียของลูกสุกรหลังป้อนเชื้อ *E. coli* F4 (วันที่ 25-29 ของการทดลอง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 ผลของ *L. salivarius* ต่อจำนวนวันที่ท้องเสียของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
จำนวนลูกสุกรทั้งหมด (ตัว)	114	87		
ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่ท้องเสีย day 1-24 (วัน)	4.80	4.25	0.245	0.278
ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่ท้องเสีย day 25-29 (วัน)	3.10	2.80	0.198	0.588
ค่าเฉลี่ยจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสีย day 1-24 (ตัว)	6.80	4.70*	0.488	0.033

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 ผลของ *L. salivarius* ต่อปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml)

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม *L.salivarius*	SEM	p-value
ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด				
วันที่ 5	8.70	9.01	0.107	0.155
วันที่ 10	8.64	8.93	0.104	0.177
วันที่ 17	8.26	8.50	0.145	0.423
วันที่ 24	8.05	8.39	0.146	0.306
ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด				
วันที่ 5	8.16	8.23	0.101	0.724
วันที่ 10	8.07	8.15	0.165	0.838
วันที่ 17	7.62	8.03	0.159	0.202
วันที่ 24	7.63	7.63	0.140	0.988
ปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด				
วันที่ 5	7.83	8.07	0.144	0.420
วันที่ 10	7.04	8.51**	0.171	0.001
วันที่ 17	7.73	8.17	0.140	0.118
วันที่ 24	7.67	8.23	0.157	0.078

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 10 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml)

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม *L.salivarius*	SEM	p-value
TLC:TBC ratio				
วันที่ 5	0.90	0.90	0.022	0.971
วันที่ 10	0.87	0.95	0.022	0.073
วันที่ 17	0.93	0.96	0.021	0.584
วันที่ 24	0.95	0.98	0.021	0.475
TCC:TBC ratio				
วันที่ 5	0.93	0.91	0.013	0.401
วันที่ 10	0.93	0.91	0.015	0.460
วันที่ 17	0.92	0.94	0.022	0.669
วันที่ 24	0.94	0.91	0.017	0.403
TLC:TCC ratio				
วันที่ 5	0.96	0.98	0.021	0.632
วันที่ 10	0.93	1.05	0.034	0.071
วันที่ 17	1.02	1.01	0.020	0.959
วันที่ 24	1.01	1.08	0.030	0.237

หมายเหตุ TBC คือ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count)
TCC คือ ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform count)
TLC คือ ปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด (Total lactobacillus count)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 ผลของ *L. salivarius* ต่อปริมาณของแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml)

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม *L.salivarius*	SEM	p-value
ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด				
Duodenum	5.13	6.32*	0.282	0.032
Proximal Jejunum	5.69	6.99*	0.294	0.021
Distal Jejunum	6.51	7.69*	0.274	0.027
Ileum	6.23	7.79*	0.337	0.014
ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด				
Duodenum	5.14	5.95	0.519	0.452
Proximal Jejunum	5.68	6.71	0.600	0.374
Distal Jejunum	5.31	6.16	0.521	0.434
Ileum	5.02	6.06	0.455	0.268
ปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด				
Duodenum	5.41	6.73	0.415	0.116
Proximal Jejunum	5.79	6.93	0.390	0.124
Distal Jejunum	6.43	6.88	0.342	0.532
Ileum	5.54	6.71	0.401	0.149

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 12 ผลของ *L. salivarius* ต่ออัตราส่วนของปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ (Contents) ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (Log_{10} cfu/ml)

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
TLC:TBC ratio				
Duodenum	1.10	1.06	0.076	0.767
Proximal Jejunum	1.09	0.99	0.093	0.568
Distal Jejunum	1.02	0.89	0.063	0.301
Ileum	0.88	0.86	0.053	0.851
TCC:TBC ratio				
Duodenum	1.06	0.93	0.114	0.537
Proximal Jejunum	1.04	0.96	0.111	0.707
Distal Jejunum	0.81	0.79	0.064	0.879
Ileum	0.79	0.79	0.061	0.988
TLC:TCC ratio				
Duodenum	1.41	1.99	0.176	0.526
Proximal Jejunum	1.46	1.05	0.177	0.227
Distal Jejunum	1.49	1.28	0.176	0.565
Ileum	1.28	1.97	0.163	0.802

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

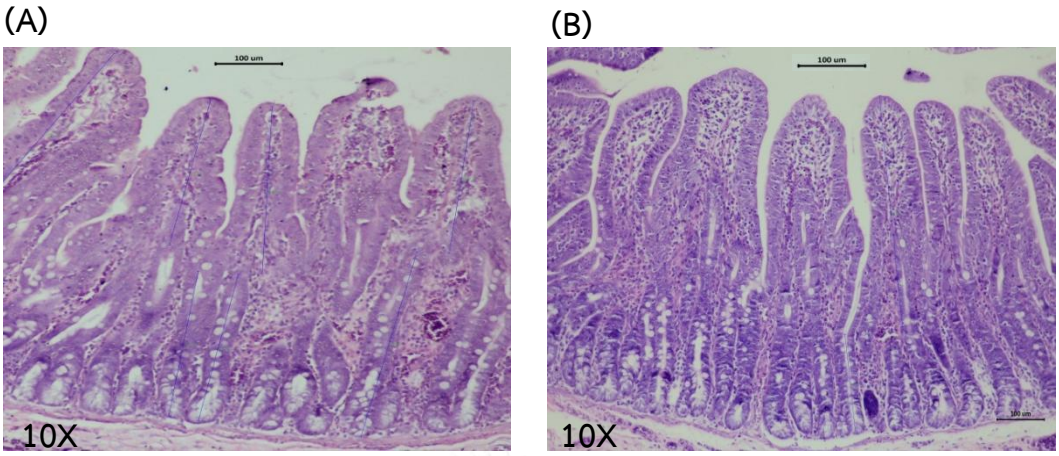
หมายเหตุ TBC คือ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count)
TCC คือ ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform count)
TLC คือ ปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมด (Total lactobacillus count)

ตารางที่ 13 ผลของ *L. salivarius* ต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

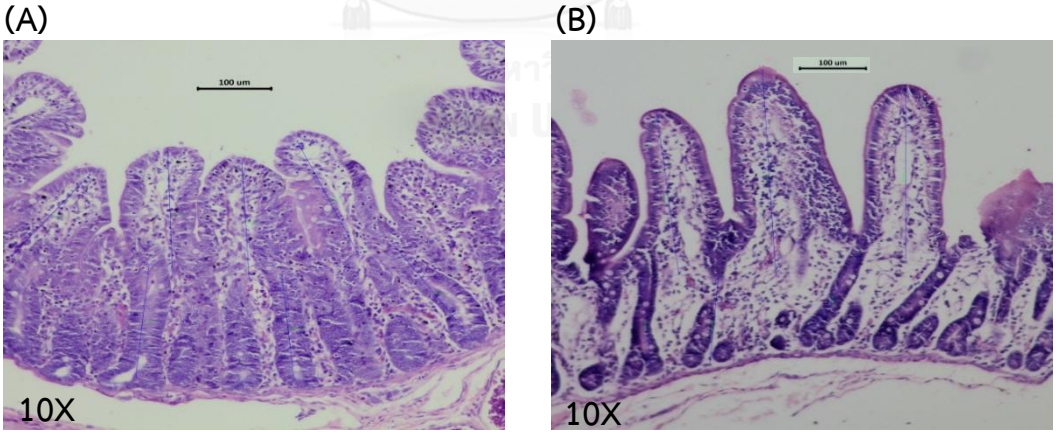
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม *L.salivarius*	SEM	p-value
Villi height (VH;µm)				
Duodenum	251.13	297.65**	9.169	0.007
Proximal Jejunum	253.85	290.41**	6.871	0.004
Distal Jejunum	258.36	281.82**	4.416	0.004
Ileum	158.01	175.10	6.377	0.199
Crypt depth (CD;µm)				
Duodenum	135.85	142.83	5.059	0.509
Proximal Jejunum	123.53	132.16	3.296	0.254
Distal Jejunum	129.83	130.68	3.353	0.904
Ileum	107.55	105.88	4.054	0.849
Villi height:Crypt depth ratio (VH:CD ratio)				
Duodenum	1.91	2.12*	0.055	0.048
Proximal Jejunum	2.11	2.26	0.046	0.116
Distal Jejunum	2.02	2.25	0.064	0.068
Ileum	1.48	1.75	0.075	0.077

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

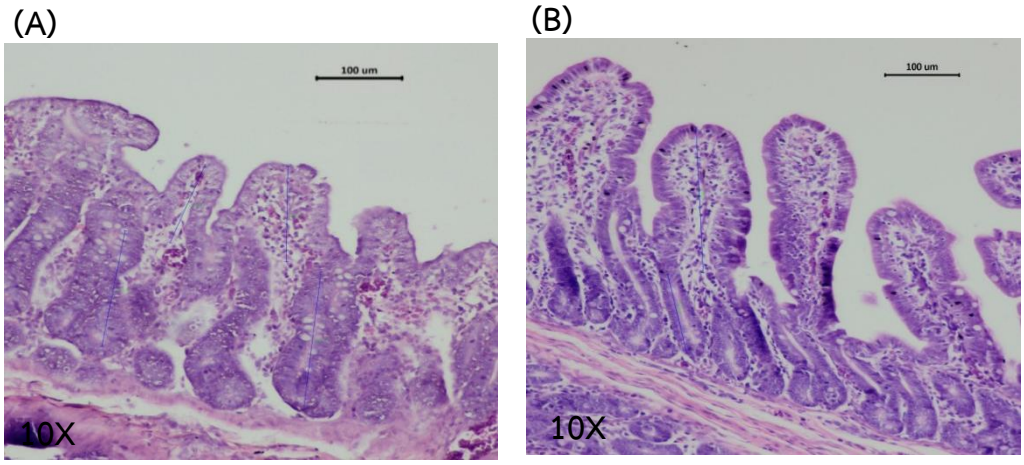
** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.01



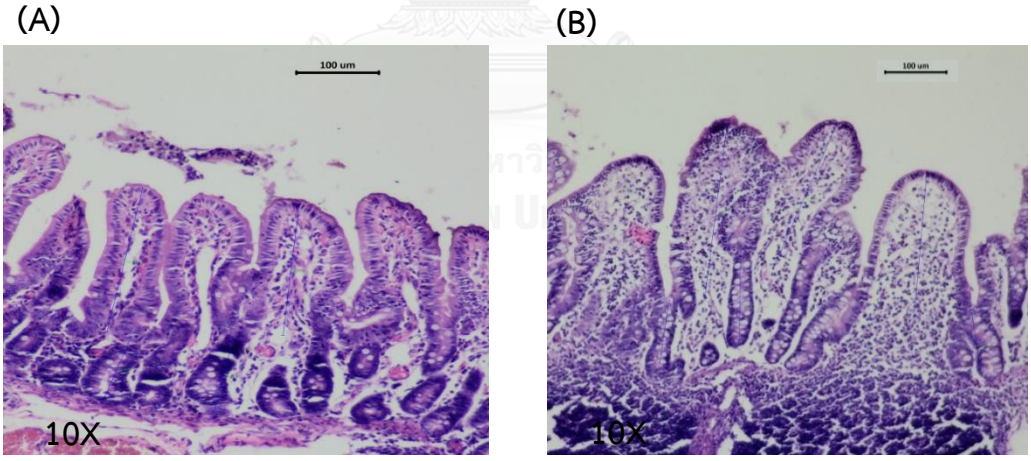
ภาพที่ 3 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม L. salivarius 10^9 cfu/ml



ภาพที่ 4 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กเจจูนัมส่วนต้น (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม L. salivarius 10^9 cfu/ml



ภาพที่ 5 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมส่วนท้าย (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml



ภาพที่ 6 ผลของการเสริม *L. salivarius* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนอิเลียม (μm) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 (A) กลุ่มควบคุม (B) กลุ่มที่เสริม *L. salivarius* 10^9 cfu/ml

ตารางที่ 14 ผลของ *L. salivarius* ต่อความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (ng/ml) ในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4

	กลุ่มควบคุม	**กลุ่มที่เสริม *L.salivarius***	**SEM**	**p-value**
Duodenum	38.70	31.47	4.288	0.424
Proximal Jejunum	38.41	27.48	3.997	0.130
Distal Jejunum	34.51	26.29	3.135	0.147

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีอัตราการเจริญเติบโต (ADG) เพิ่มขึ้น และมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกร อาจเป็นผลมาจากการปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกรที่ได้รับ *L. salivarius* ซึ่งมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีการดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น และเชื้อ *L. salivarius* ที่เข้าสู่ทางเดินอาหาร อาจช่วยให้สภาพแวดล้อมในทางเดินอาหารเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus* spp. ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น และอาจช่วยควบคุมแบคทีเรียบางชนิดไม่ให้ก่อโรค จึงทำให้มีการท้องเสียของลูกสุกรในช่วงก่อนหย่านมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม จึงส่งผลให้ลูกสุกรมีน้ำหนักตัวที่ดีขึ้นและมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตดีขึ้น โดย Meng และคณะ (2010) กล่าวว่า Lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดแลคติคและเอนไซม์โปรตีเอสได้ ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2011) ทำการศึกษาในลูกสุกรแรกเกิด โดยป้อนเชื้อ *L. salivarius* B1 ความเข้มข้น 5×10^9 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในวันแรกเกิด ป้อนปริมาตร 2 มิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการทดลอง และป้อนปริมาตร 3 มิลลิลิตรในวันที่ 11 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* B1 มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการศึกษาของ Banach และคณะ (2002) ซึ่งศึกษาในลูกสุกรแรกเกิดถึงก่อนหย่านม พบว่าลูกสุกรที่เสริม *L. brevis* 1E-1 มีอัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น Yu และคณะ (2008) รายงานการศึกษาในลูกสุกรหย่านม โดยใช้เชื้อ *L. fermentum* ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (3.2×10^6, 5.8×10^7 และ 2.9×10^8 cfu/g) และ *Lactobacilli* complexes (*L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* และ *L. fermentum*) ความเข้มข้น 3.4×10^5 cfu/g ของอาหาร พบว่า ลูกสุกรกลุ่มที่ได้รับ *Lactobacilli* complexes และ *L. fermentum* มีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการทดลองนี้ยังพบว่าลูกสุกรในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักตัวหลังจากป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนป้อนเชื้อ แต่กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีน้ำหนักตัวลดลงแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนป้อนเชื้อ ซึ่งน้ำหนักตัวที่ลดลงนั้นอาจจะเป็นผลมาจากการท้องเสียของลูกสุกรหลังได้รับเชื้อ *E. coli* F4 แต่ในกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีน้ำหนักตัวลดลงแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งอาจสืบเนื่องจากการเสริม *L. salivarius* ในช่วงแรกที่ช่วยให้ลำไส้สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดี และช่วยให้ pH ในทางเดินอาหาร

ลดลง และแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารสามารถเจริญเติบโตได้ดี จึงสามารถควบคุมการก่อโรคของเชื้อ *E. coli* F4 ได้ นอกจากนี้ *Lactobacillus* spp. ที่อยู่ในทางเดินอาหาร อาจกระตุ้นให้มีการหลั่งสารเมือกในทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันก็สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ได้ และช่วยป้องกันหรือลดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *E. coli* F4 ได้ ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* จึงมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Deplancke and Gaskins, 2001; Estienne et al., 2005; Yu et al., 2008)

ค่า pH ของของเหลวในลำไส้

ค่า pH ของของเหลวในลำไส้เล็กส่วนต้นของลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีความเป็นกรดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ในลำไส้เล็กส่วนอื่นไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งการใช้แบคทีเรีย *L. salivarius* จะช่วยทำให้ค่า pH ในทางเดินอาหารมีความเป็นกรดมากขึ้น เนื่องจากการผลิตกรดแลคติคและกรดไขมันสายสั้น ทำให้สภาพแวดล้อมในลำไส้ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค โดย *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลผ่านกระบวนการหมักซึ่งสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง หรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น และสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เช่น กรดแลค ติกซึ่งมีค่า pKa 3.85 กรดฟอร์มิกมีค่า pKa 3.74 กรดอะซิติกมีค่า pKa 4.76 เป็นต้น โดยอาหารที่กินเข้าไปจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารไม่เกิน 6 ชั่วโมง (Laerke and Hedemann, 2012) และในขณะเดียวกันกระเพาะอาหารจะมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับสภาพแวดล้อมในกระเพาะอาหารให้เหมาะ สมต่อการทำงานของเอนไซม์เปปซิน ซึ่งลูกสุกรในช่วงแรกเกิดถึงช่วงหย่านมอาจจะยังมีการสร้างเอนไซม์ในทางเดินอาหารที่ไม่สมบูรณ์ (Corring et al., 1978) จึงมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกในปริมาณน้อย ทำให้ค่า pH ในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดอ่อน (pH 5-6) ประกอบกับอาหารที่อยู่ในกระเพาะอาหารเป็นเวลานาน และเกิดกระบวนการหมักของ *L. salivarius* และแบคทีเรียอื่นๆ ทำให้ได้สารที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (Lawlor et al., 2005) จึงทำให้ของเหลวที่ส่งมาจากกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็กส่วนต้นมีความเป็นกรด เมื่อเปรียบเทียบกับลำไส้เล็กในส่วนอื่นๆ นอกจากนี้ในระบบทางเดินอาหารจะมีกระบวนการ Homeostasis เพื่อรักษาระดับ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งในการลด pH ของของเหลวที่มาจากกระเพาะอาหารที่เป็นกรดให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในลำไส้เล็ก ซึ่งมีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลาง ในลำไส้เล็กจึงมีการหลั่งสารไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และสารเมือกเพื่อลดความเป็นกรดของอาหารและเคลือบผนังลำไส้ ป้องกันการถูกทำลายจากกรดที่มากับของเหลวจากกระเพาะอาหาร ดังนั้นเมื่อของเหลวถูกส่งไปยังลำไส้เล็กส่วนอื่นๆ จึงมี pH ค่อนข้างเป็นกลาง สอดคล้องกับการศึกษาของ Lahteinen และคณะ (2014) ทำการศึกษาในลูกสุกรหย่านม โดยใช้เชื้อ *L. brevis* ATCC 8287 ความเข้มข้น 10^{10}

cfu/ml พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. brevis* ATCC 8287 มีค่า pH ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม อิเลียม ไส้ตัน และลำไส้ใหญ่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า *L. salivarius* เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่ pH 3 ได้ถึง 66.5 % และสามารถต้านทานเกลือน้ำดี (Porcine bile salts) ในทางเดินอาหารได้ 29% ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้เสริมให้แก่สัตว์จะต้องมีคุณสมบัติในด้านความคงทนต่อ pH ในทางเดินอาหาร เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากสารที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเพื่อให้สามารถไปเจริญเติบโตที่ลำไส้เล็กได้ (Iñiguez-Palomares et al., 2007)

อัตราการท้องเสีย

กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีอัตราการท้องเสีย และคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรในช่วงอายุ 1-24 วัน ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่มีจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสียในช่วงวันที่ 1-24 ของการทดลองลดลง และมีแนวโน้มที่จะมีคะแนนการท้องเสียของลูกสุกรหลังป้อนเชื้อ *E. coli* F4 ลดลง โดยเชื้อ *E. coli* F4 จะไปยับยั้งกลไกในการดูดกลับอิเล็กโทรไลต์ภายในลำไส้ จึงทำให้มีการคั่งค้างของอิเล็กโทรไลต์อยู่ในลำไส้เป็นจำนวนมาก ร่างกายจึงต้องมีการดึงน้ำภายในเซลล์ออกมาเพื่อใช้ในการขับอิเล็กโทรไลต์ส่วนเกินออกจากร่างกาย ลูกสุกรจึงมีอาการท้องเสีย แต่กลุ่มที่มีการป้อน *L. salivarius* เข้าสู่ทางเดินอาหารมีจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสียและมีแนวโน้มที่จะมีคะแนนการท้องเสียลดลงนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่ *L. salivarius* ช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ทำให้สภาพแวดล้อมในทางเดินอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค จึงอาจทำให้สามารถควบคุมการก่อโรคได้ (Huang et al., 2004; Cajarville et al., 2011) โดย *L. salivarius* จะเข้ายึดเกาะบนผนังลำไส้ มีการเพิ่มจำนวน และเกิดกระบวนการหมักทำให้ได้กรดอินทรีย์และสารประกอบ เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง Peptidoglycan และรบกวนการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของสารโพแทสเซียมในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป และการผลิตกรดอินทรีย์จะทำให้ค่า pH ในทางเดินอาหารลดลงไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค และมีการทำลาย Electrochemical proton gradient ในเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรค ทำให้ระบบการขนส่ง Substrate ผิดปกติ เซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคก็จะเสื่อมสภาพไป (Ammor et al., 2006; Giang et al., 2010) จึงทำให้ลูกสุกรที่ได้รับ *L. salivarius* มีความรุนแรงของการท้องเสียต่ำกว่าลูกสุกรกลุ่มควบคุม Rondon และคณะ (2013) ทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้เชื้อ *L. salivarius* C65 ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml พบว่า ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* C65 มีอัตราการท้องเสียต่ำกว่ากลุ่มควบคุม Zhang และคณะ (2010) ทำการศึกษาในลูกสุกรหย่านมอายุ 18 วัน โดยใช้เชื้อ *L. rhamnosus* GG ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml และวันที่ 8 ของการทดลองจะมีการป้อน ETEC K88 ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีอัตราการท้องเสียและจำนวนลูกสุกรที่ท้องเสียต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่มีการกระตุ้นด้วย ETEC K88

(Positive control) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ ETEC K88 (Negative control) นอกจากนี้ Yang และคณะ (2014) ทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* CGMCC 1258 และวันที่ 15 ของการทดลอง ทำการป้อนเชื้อ ETEC K88 ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่า ในวันที่ 18 ของการทดลอง (3 วันหลังป้อน ETEC K88) กลุ่มที่ได้รับ *L. plantarum* CGMCC 1258 มีอัตราการท้องเสียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระ

ในวันที่ 10 ของการทดลอง ลูกสุกรในกลุ่มที่เสริม *L. salivarius* มีปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระเพิ่มสูงขึ้น และวันที่ 24 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. salivarius* มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณแบคทีเรียในอุจจาระจะสามารถสะท้อนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ก่อนการหย่านมลูกสุกรได้ ดังนั้นปริมาณของเชื้อแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระที่เพิ่มขึ้น อาจแสดงให้เห็นว่าการป้อนเชื้อ *L. salivarius* ให้ลูกสุกรก่อนหย่านมจะช่วยให้มีปริมาณของเชื้อแลคโตบาซิลัสในลำไส้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ที่ pH 7 ซึ่งจะรวมถึงแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม แต่ไม่รวมปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดเนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ต้องการปัจจัยในการเจริญเติบโตที่จำเพาะ คือ ในสภาวะที่เป็นกรด pH ประมาณ 5-6 และต้องการน้ำตาลในปริมาณสูง (Wee et al., 2005) เมื่อ *L. salivarius* เข้าสู่กระเพาะอาหารจะมีการใช้น้ำตาลในน้ำนม ประกอบกับอาหารที่อยู่ในกระเพาะอาหารเป็นเวลานาน และมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริก จึงทำให้เกิดกระบวนการหมักได้เป็นกรดแลคติก (สุมณฑา, 2545) นอกจากนี้ *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสำคัญในการเข้ายึดเกาะที่ผนังลำไส้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เข้ามาภายหลังไม่สามารถเข้าเกาะที่ผนังลำไส้ได้จึงต้องถูกขับทิ้งไป ซึ่งการขับทิ้งเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระที่เพิ่มขึ้น อาจช่วยให้ความรุนแรงของอาการท้องเสียเนื่องจากการติดเชื้อ *E. coli* ลดลงได้ (Demecková et al., 2002; Lähteinen et al., 2010; Zhang et al., 2010) Takahashi และคณะ (2007) กล่าวว่า Lactic acid bacteria สามารถผลิตโมเลกุลที่เป็น Growth-promoter มีส่วนช่วยให้ *Lactobacillus* spp. ในทางเดินอาหารของลูกสุกรสามารถเจริญเติบโตได้ดี และช่วยรักษาสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่น ซึ่งการศึกษาของ Takahashi และคณะ (2007) รายงานว่า การใช้เชื้อ *L. plantarum* strain Lq80 ในลูกสุกรดูดนม ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml พบว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. plantarum* strain Lq80 มีปริมาณของเชื้อแลคโตบาซิลัสในอุจจาระเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 7 ของการทดลอง

นอกจากนี้การทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าในวันที่ 10 ของการทดลอง ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *L. salivarius* มีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดต่อปริมาณเชื้อ

แบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดต่อปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดเพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย Zhang และคณะ (2011) รายงานการศึกษาเชื้อ *L. salivarius* B1 ในลูกสุกรดูดนม พบว่า ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. salivarius* B1 มีปริมาณของเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* ในอุจจาระของทั้ง 2 กลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2010) ทำการศึกษาในลูกสุกรหย่านมอายุ 18 วัน โดยใช้เชื้อ *L. rhamnosus* GG ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml และวันที่ 8 ของการทดลองจะมีการป้อน ETEC K88 ความเข้มข้น 10^{9} cfu/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่า กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *L. rhamnosus* GG มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในอุจจาระลดลง และมีปริมาณของเชื้อ *Lactobacillus* และเชื้อ *Bifidobacteria* ในอุจจาระเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการป้อน ETEC K88

ปริมาณของแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้

จากการทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้น เจจูนัมส่วนท้าย และอิเลียมของลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณแลคโตบาซิลัสทั้งหมดและปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณแบคทีเรียในของเหลวของลำไส้ที่ศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นปริมาณแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงหลัง หย่านมลูกสุกรและได้รับเชื้อ *E. coli* F4 ซึ่งลูกสุกรที่เสริม *L. salivarius* มีปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นนั้น อาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของลูกสุกรที่เพิ่มขึ้น โดยในช่วงหย่านมลูกสุกรซึ่งเป็นช่วงวิกฤติ มีการเปลี่ยนลักษณะอาหารจากอาหารเหลวเป็นอาหารแข็ง และมีความน่ากินต่ำกว่าน้ำนมของแม่สุกรที่ลูกสุกรเคยได้รับทำให้ลูกสุกรมีการกินได้ลดลง ซึ่งอาจส่งผลให้สภาพแวดล้อมในทางเดินอาหาร ค่อนข้างเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มได้ (Cai et al., 2014) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มบางชนิดก็เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในทางเดินอาหาร โดยมีรายงานว่าหลังจากหย่านมลูกสุกรจะมีแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มในลำไส้เล็กส่วนอิเลียมเพิ่มสูงขึ้น (Pieper et al., 2006) สอดคล้องกับ Fuller (1989) กล่าวว่า ในช่วงหย่านมลูกสุกรหรือช่วงที่ลูกสุกรมีความเครียดจะทำให้มีปริมาณของโคลิฟอร์มแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น และปริมาณของ *Lactobacillus* spp. ในทางเดินอาหารมีแนวโน้มลดลง แต่การเสริม Lactic acid bacteria ในลูกสุกรจะสามารถเพิ่มการผลิตสารเมือกในลำไส้ได้ โดยสารเมือกจะช่วยป้องกัน Epithelial cell ทำให้แบคทีเรียก่อโรคที่เข้าสู่ทางเดินอาหารไม่สามารถยึดเกาะที่ผนังลำไส้ได้ (Yang et al., 2015) จึงอาจทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคลดลงได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2011) ซึ่งทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้เชื้อ *L. salivarius* B1 พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. saivarius* B1 มีปริมาณของเชื้อ *E.coli* และ *Enterococcus* ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม และอิเลียมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Konstantinov และคณะ (2008) ทำการศึกษาในลูกสุกรหย่านม โดยใช้เชื้อ *L. sobrius* DSM 16698 และในวันที่ 7 ของการทดลอง มี

การป้อนเชื้อ *E.coli* K 88 ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml พบว่า กลุ่มที่เสริม *L. sobrius* มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแลคโตบาซิลัสในของเหลวของลำไส้เล็กส่วนอิเลียมเพิ่มสูงขึ้น และมีปริมาณของเชื้อ ETEC ในของเหลวของลำไส้เล็กส่วนอิเลียมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งรายงานของ Lähteinen และคณะ (2015) กล่าวว่าการเสริมแบคทีเรียแลคโตบาซิลัสชนิดรวม จะสามารถเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดในของเหลวของลำไส้ส่วนเจจูนัมได้ และการใช้ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยในการปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ โดยการผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารต้านจุลชีพอื่นๆ ช่วยลดความเครียดที่เกิดขึ้นในลูกสัตว์ในช่วงก่อนหย่านม ควบคุมสภาพแวดล้อมในลำไส้ และลดผลกระทบจากเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ไม่สามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงได้ (Pieper et al., 2009; Giang et al., 2010) ซึ่งคำแนะนำในการใช้สารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์ควรมีระดับความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 10^{9} cfu/g (Simon et al., 2005) และในยุโรปมีการใช้สารเสริมชีวนะเป็นวัตถุเติม (Feed additive) ในอาหารสัตว์ ควรมีความเข้มข้น 10^{10} cfu/g การใช้ในสารผสมล่วงหน้า (Premix) ควรมีความเข้มข้น 10^{8} cfu/g และการใช้สารเสริมชีวนะในการผลิตอาหารสัตว์แบบอัดเม็ดควรมีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 10^{6} cfu/g (Yu et al., 2008)

สัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกร

การศึกษาผลของ *L. salivarius* ต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้ของลูกสุกรในระยะดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* มีความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้นและส่วนท้ายเพิ่มสูงขึ้น และมีแนวโน้มที่จะมีอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์ (VH:CD ratio) ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ซึ่งวิลไลในทางเดินอาหารเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ความสามารถในการดูดซึมสารอาหารของลำไส้เล็ก การผลัดเปลี่ยนเซลล์ที่หมดสภาพของวิลไลจะสะท้อนให้เห็นถึงความสมดุลของการสร้างเซลล์ทดแทนของคริปท์ และอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์ สามารถใช้ในการประเมินสุขภาพของลำไส้ได้ (Pluske et al., 1997) โดยความสูงของวิลไลของกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอาจจะเป็นผลจากการท้องเสียของลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* ที่มีความรุนแรงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมจึงทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อความสูงของวิลไล นอกจากนี้แบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* ยังสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนาของเยื่อบุผนังลำไส้ และการผลิตเซลล์ Enterocyte ของคริปท์ที่เพิ่มขึ้นอาจช่วยให้ความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้นได้ (Shirkey et al., 2006; Suo et al., 2012) ซึ่งอาการท้องเสียจะส่งผลต่อความสูงของวิลไล โดยทำให้ลูกสุกรมีการถ่ายเหลวและสูญเสียน้ำมาก ความอยากอาหารและการกินได้ลดลง ส่งผลให้มีการหลุดลอกของเซลล์ที่ส่วนบนของวิลไลมากขึ้น และในช่วงหย่านมลูกสุกรจะต้องมีการเปลี่ยนรูปแบบของอาหารจากอาหารเหลวเป็น

อาหารแข็ง ความน่ากินต่ำ และประกอบกับการมีแบคทีเรียฉวยโอกาสที่จะก่อให้เกิดโรค จึงทำให้เกิดการฝ่อของวิลไลและมีการอักเสบของคริปท์ได้ (Yoshida et al., 2009) โดย Gu และคณะ (2002) รายงานการเปลี่ยนแปลงของวิลไลและคริปท์ในลำไส้เล็กของลูกสุกรที่อายุต่างๆ พบว่า ความสูงของวิลไลของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนท้าย และอิเลียม ในลูกสุกรหย่านมที่อายุ 29 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนท้าย และอิเลียมในลูกสุกรอายุ 18 วัน ($P<0.05$) และมีความลึกของคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมของลูกสุกรอายุ 29 วันสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับความลึกของคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมของลูกสุกรอายุ 18 วัน ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันในลำไส้เล็กส่วนอื่น ซึ่งการใช้ *L. salivarius* ในลูกสุกรจะช่วยป้องกันลำไส้ ลดความรุนแรงจากเชื้อก่อโรคทำให้ความรุนแรงของอาการท้องเสียลดลง โดยมีการผลิตสารที่เป็นกรดและแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ซึ่งสามารถยับยั้งหรือรบกวนการทำงานของกลไกภายในเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรค ทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคเสื่อมสภาพไปหรือไม่สามารถผลิตสารพิษที่ใช้ในการก่อโรคได้ ซึ่งจะช่วยลดการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ได้ (Suo et al., 2012) Rodrigues และคณะ (2007) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อ *L. acidophilus* ความเข้มข้น 2.5×10^8 cfu/g และกลุ่มที่เสริมแบคทีเรียชนิดรวม (*L. acidophilus, E.faecium* และ *Bifidobacterium bifidum*) ความเข้มข้น 3.33×10^6 cfu/g ในลูกสุกรดูดนม พบว่า ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมและเจจูนัมของกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียชนิดรวมมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้น และมีความลึกของคริปท์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Yang และคณะ (2014) ทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* CGMCC 1258 และในวันที่ 15 ของการทดลอง มีการป้อนเชื้อ ETEC K88 ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาณ 10 มิลลิลิตร พบว่า ลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ *L. plantarum* CGMCC 1258 มีความสูงของวิลไลและอัตราส่วน VH:CD ratio ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และเจจูนัมสูงกว่ากลุ่มควบคุม

ความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกร

การเสริม *L. salivarius* ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ในลูกสุกรดูดนมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 มีความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การเสริม *L. salivarius* ให้แก่สัตว์จะมีแนวโน้มในการกระตุ้นการผลิต IgA ในลำไส้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่ง IgA เป็นภูมิคุ้มกันในเยื่อเมือก ที่มาจากการพัฒนาของ B-lymphocyte ที่สามารถพบได้ในสารคัดหลั่ง เช่น เลือด น้ำลาย และสารเมือกในลำไส้ โดยชิ้นส่วนของแบคทีเรีย *L. salivarius* ไปจับกับ Toll-like receptors 2 (TLRs-2) ทำหน้าที่เป็น Antigen-presenting cells เพื่อส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้มีการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด TGF-β, IL-4, IL-5, IL-6 และ IL-10 ซึ่งจะมีผลในการกระตุ้นให้มีการผลิต IgA เพิ่มขึ้น (Shida et al., 2009; Yoshida et al., 2009; Drago et

al., 2010) Deng และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้เชื้อ *L. salivarius* B1 และ *B. subtilis* RJGP16 พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* B1 สามารถเพิ่มจำนวนของ IgA producing cell ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Lamina propria) ของชั้นเยื่อเมือกในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมและอิเลียมได้ และการศึกษาของ Konstantinov และคณะ (2008) ทำการศึกษาในลูกสุกรดูดนม โดยใช้ *L. sobrius* DSM 16698 ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml ในอาหารลูกสุกรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *L. sobrius* DSM 16698 มีความเข้มข้นของ IgA ในน้ำลายและในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2010) ทำการศึกษาในลูกสุกรหย่านมอายุ 18 วัน โดยใช้เชื้อ *L. rhamnosus* GG ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml และวันที่ 8 ของการทดลองมีการป้อนเชื้อ ETEC (K91, K88) ความเข้มข้น 10^{9} cfu/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่า ลูกสุกรในกลุ่มควบคุมที่มีการป้อนเชื้อ ETEC (Positive control) และกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีความเข้มข้นของ secretory IgA (sIgA) ในเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และ อิเลียมเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ *L. rhamnosus* GG และเชื้อ ETEC โดยมีรายงานกล่าวว่า IgA oligosaccharide สามารถป้องกันการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค *E. coli* K88 ในเยื่อเมือกลำไส้ของลูกสุกรได้ และ sIgA มีส่วนช่วยในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ (Gabriela et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคเข้าสู่ทางเดินอาหาร เชื้อก่อโรคจะสามารถเข้าจับกับ TLRs-4 ที่มีความจำเพาะกับ *Lipopolysaccharide* (LPS) ซึ่งสามารถพบได้ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และสามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายได้เช่นกัน (Takeuchi et al., 1999; Takeda and Akira, 2005) สอดคล้องกับรายงานของ Li และคณะ (2012) กล่าวว่า การติดเชื้อก่อโรค ETEC F4 สามารถเพิ่มปริมาณของ TLRs-4 ที่เซลล์เยื่อบุผิวของวิลไลและคริปท์ และเพิ่มปริมาณของ IL-8 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดการอักเสบในลำไส้ได้ แต่แบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid bacteria สามารถผลิตสารต้านการอักเสบผ่านทาง TLRs -2 และ TLRs-9 ได้

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า ซึ่งในแต่ละวันร่างกายอาจได้รับแบคทีเรียหลายชนิดอาจเป็นทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค การตอบสนองเบื้องต้นของร่างกายจึงมีการหลั่งสารเมือกในทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่เสริม *L. salivarius* มีความเข้มข้นของ IgA ในลำไส้เล็กไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม จึงไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนว่าเกิดจากการกระตุ้นของแบคทีเรียชนิดใดซึ่งควรมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริม *L. salivarius* ที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ในลูกสุกรดูดนมที่มีการกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* F4 ส่งผลให้น้ำหนักตัวก่อนหย่านมดีขึ้น จำนวนลูกสุกรที่ท้องเสียลดลง ในวันที่ 10 ของการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียแลคโตบาซิลัสทั้งหมดในอุจจาระได้ ลดค่า pH ของของเหลวในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในของเหลวของลำไส้เพิ่มขึ้น สามารถปรับปรุงลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ โดยการเพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัมส่วนต้น และเจจูนัมส่วนท้าย และเพิ่มอัตราส่วนของความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมได้ และสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรได้

โดยแนวทางในการเลือกใช้ *L. salivarius* เพื่อเสริมให้กับลูกสุกรในทางอุตสาหกรรมนั้น อาจจะช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากการป่วยหรือการตายของลูกสุกร เมื่อลูกสุกรได้รับ *L. salivarius* เข้าสู่ทางเดินอาหารจะมีการเพิ่มความสูงของวิลไล ทำให้สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดี กระตุ้นการทำงานของชั้นเยื่อเมือกเพื่อใช้ในการตอบสนองต่อการป้องกันแบคทีเรียและมีการปรับสภาพแวดล้อมของทางเดินอาหาร ให้เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโตของแบคทีเรียประจำถิ่น เมื่อได้รับแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เข้าสู่ทางเดินอาหาร ร่างกายก็อาจจะสามารถตอบสนองในการยับยั้งหรือป้องกันการก่อโรค ซึ่งจะช่วยบรรเทาความรุนแรงหรือความเสียหายจากการเกิดโรคในทางเดินอาหารได้ และเมื่ออาการป่วยมีความรุนแรงลดน้อยลงก็อาจช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

กรมปศุสัตว์.กองแผนงาน 2557. ปริมาณการส่งออกเนื้อสุกรแปรรูปและเนื้อสุกรแช่เย็น/แช่แข็ง ปี 2546 – 2556 ณ เวลาเดียวกัน (มกราคม - ธันวาคม) [Online] แหล่งที่มา: http://planning.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=712:section-13&catid=54:section-13&Itemid=87.

คมแข พิลาสมบัติ, นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิศร เสวตวิวัฒน์ 2553. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28(2): 19-28.

สุมณฑา วัฒนสินธ์ 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์ตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล, กรุงเทพมหานคร.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E and Chevallier I 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17(6): 454-461.

AOAC 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. In: Association of Offical Agricultural Chemists, United states of America.

Aumaitre A and Seve B 1978. Nutritional importance of colostrum in the piglet. Ann Rech Vet. 9(2): 181-192.

Banach S, Rehberger T, Parrott T, Maxwell C, Coalson J and Touchette K 2002. Influence of Lactobacillus brevis Strain 1E-1 on the gastrointestinal microflora of pre-weaning and weaning pigs. Presented at the 2002 American Society of Animal Science Meeting.

Barszcz M and Skomiał J 2011. The development of the small intestine of piglets-chosen aspects. J Anim Feed Sci. 20(1): 3-15.

Bederska-Lojewska D and Pieszka M 2011. Modulating gastrointestinal Microflora of pigs through nutrition using feed additives. Ann Anim Sci. 3(11): 333-355.

Begum S, Patra MK, Ngullie L, Ngullie E and Das RK 2014. Antimicrobial Resistance Pattern in Swine Colibacillosis under Farm and Field Condition in Nagaland. Int J Livest Res. 4(1): 81-88.

Bourne FJ 1973. The immunoglobulin system of the suckling pig. Proc Nutr Soc. 32(3): 205-215.

Brotz H, Bierbaum G, Markus A, Molitor E and Sahl HG 1995. Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. Antimicrob Agents Chemother. 39(3): 714-719.

Cai Y, Pang H, Tan Z, Wang Y, Zhang J, Xu C, Yang J and Cao Y 2014. Application of Lactic Acid Bacteria for Animal Production. In: Lactic Acid Bacteria. Springer Netherlands. 443-491.

Cajarville C, Brambillasca S and Zunino P 2011. Utilización de probióticos en monogástricos: aspectos fisiológicos y productivos relacionados al uso de sub-productos de agroindustrias y de pasturas en lechones. Rev Porcicultura Iberoamericana. 1(2): 1-11.

Carvalho D, Finkler F, Grassotti TT, Kunert Filho HC, Lima FEdS, Soares BD, Rossato JM, Cunha ACd, Brito KCTd and Brito BGd 2015. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Escherichia coli* strains of environmental origin. Cienc Rural. 45(7): 1249-1255.

Castillo M 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

Chan G, Farzan A, DeLay J, McEwen B, Prescott JF and Friendship RM 2013. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. Can J Vet Res. 77(4): 254-260.

Chandler D and Mynott T 1998. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. Gut. 43(2): 196-202.

Cho JH, Zhao PY and Kim IH 2011. Probiotics as a dietary additive for pigs: a review. J Anim Vet Adv. 10(16): 2127-2134.

Collado MC, Isolauri E, Salminen S and Sanz Y 2009. The impact of probiotic on gut health. Curr Drug Metab. 10(1): 68-78.

Corring T, Aumaitre A and Durand G 1978. Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. Nutr Metab. 22(4): 231-243.

Crosnier C, Stamataki D and Lewis J 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. Nature Rev Genet. 7(5): 349-359.

de Vrese M and Schrezenmeir J 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In: Food Biotechnology. Springer. 1-66.

Demecková V, Kelly D, Coutts AGP, Brooks PH and Campbell A 2002. The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows. Int J Food Microbiol. 79(1–2): 85-97.

Deng J, Li Y, Zhang J and Yang Q 2013. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. Res Vet Sci. 94(1): 62-68.

Deplancke B and Gaskins HR 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr. 73(6): 1131-1141.

Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H and Nes IF 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc Natl Acad Sci USA. 104(7): 2384-2389.

Dobson A, Cotter PD, Ross RP and Hill C 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait. Appl Environ Microbiol. 78(1): 1-6.

Drago L, Nicola L, Iemoli E, Banfi G and De Vecchi E 2010. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an in vitro model. BMC Res Notes. 3(1): 44.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F and Collins JK 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr. 73(2): 386-392.

Estienne M, Hartsock T and Harper A 2005. Effects of antibiotics and probiotics on suckling pig and weaned pig performance. Intern J Appl Res Vet Med. 3(4): 303-308.

FDA FaDA 2001. Bacteriological Analytical Manual (Online). United States of America.

Ferrari C, Sbardella P, Bernardi M, Coutinho M, Vaz I, Wentz I and Bortolozzo F 2014. Effect of birth weight and colostrum intake on mortality and performance of piglets after cross-fostering in sows of different parities. Prev Vet Med. 114(3): 259-266.

Fuller AR 1989. Probiotics in man and animals. J Applied Bacteriol. 66(5): 365-378.

Gabriela R-CM, Evelia A-F, Luz V-M and Joy W 2007. *Escherichia coli* K88 Interaction with IgA Oligosaccharides. EXCLI J. 6: 10-22.

Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME and Perdigon G 2007. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clin Vaccine Immunol. 14(5): 485-492.

Galyean M 2010. Laboratory procedure in animal nutrition research. In, Department of animal and Food Sciences, Texas Tech University. 188.

Gebert S, Davis E, Rehberger T and Maxwell CV 2011. *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. Benef Microbes. 2(1): 35-45.

Giang HH, Viet TQ, Ogle B and Lindberg JE 2010. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. Livest Sci. 129(1): 95-103.

Gu X, Li D and She R 2002. Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet. Arch Tierernahr. 56(4): 275-286.

Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ and Nyachoti CM 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 97(2): 207-237.

Herich R and Levkut M 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet Med. 47(6): 169-180.

Huang C, Qiao S, Li D, Piao X and Ren J 2004. Effects of *lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. Asian-Australas J Anim Sci. 17(3): 401-409.

Huang L, Lu Z, Yuan Y, Lü F and Bie X 2006. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus based on response surface methodology. J Ind Microbiol Biotechnol. 33(1): 55-61.

Iñiguez-Palomares C, Pérez-Morales R and Acedo-Félix E 2007. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. Rev Latinoam Microbiol. 49(3-4): 46-54.

Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, Hiroi T, Tamagawa H, Iijima H, Kunisawa J, Yuki Y and Kiyono H 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc Natl Acad Sci USA. 101(16): 6110-6115.

Jin L and Zhao X 2000. Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine–a review. App microbiol biotechnol. 54(3): 311-318.

Kilbride AL, Mendl M, Statham P, Held S, Harris M, Cooper S and Green LE 2012. A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112 commercial pig farms in England. Prev Vet Med. 104(3): 281-291.

Koma Biotech INC 2010. Pig IgA ELISA Kit pink-ONE, Seoul, Korea.

Konstantinov SR, Smidt H, Akkermans AD, Casini L, Trevisi P, Mazzoni M, De Filippi S, Bosi P and de Vos WM 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. FEMS Microbiol Ecol. 66(3): 599-607.

Kragl U 2005. Reactive extraction. In: In Technology Transfer in Biotechnology. Netherlands.

Laerke H and Hedemann M 2012. The digestive system of the pig. [Online] http://vsp.lf.dk/~/media/Files/Laerebog_fysiologi/Chapter%205.pdf.

Lähteinen T, Lindholm A, Rinttilä T, Junnikkala S, Kant R, Pietilä TE, Levonen K, von Ossowski I, Solano-Aguilar G, Jakava-Viljanen M and Palva A 2014. Effect of

Lactobacillus brevis ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. Vet Immunol Immunopathol. 158(1–2): 14-25.

Lähteinen T, Malinen E, Koort JM, Mertaniemi-Hannus U, Hankimo T, Karikoski N, Pakkanen S, Laine H, Sillanpää H and Söderholm H 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. Anaerobe. 16(3): 293-300.

Lähteinen T, Rinttilä T, Koort JMK, Kant R, Levonen K, Jakava-Viljanen M, Björkroth J and Palva A 2015. Effect of a multispecies *lactobacillus* formulation as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. Livest Sci. 180: 164-171.

Langen LV, Mirjam A and Dieleman LA 2009. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. Inflamm Bowel Dis. 15(3): 454-462.

Lawlor PG, Lynch PB, Caffrey PJ, O'Reilly JJ and O'Connell MK 2005. Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. Irish Vet J. 58(8): 447.

Lecce JG, Morgan DO and Matrone G 1964. Effect of feeding colostral and milk compositions on the cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in neonatal pigs. J Nutr. 84: 43-48.

Li X-Q, Zhu Y-H, Zhang H-F, Yue Y, Cai Z-X, Lu Q-P, Zhang L, Weng X-G, Zhang F-J and Zhou D 2012. Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: intestinal microbiota and immune imbalances. PLoS One. 7(7): 1-12.

Liu P, Piao X, Thacker P, Zeng Z, Li P, Wang D and Kim S 2010. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with K88. J Anim Sci. 88(12): 3871-3879.

Ljungh A and Wadstrom T 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr Issues Intestinal Microbiol. 7(2): 73-90.

Madsen KL 2001. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. Clin Invest Med. 24(5): 250-257.

Mantis NJ, Rol N and Corthésy B 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol. 4(6): 603-611.

Maré L 2009. The use of prebiotics and probiotics in pigs: A review. *in* Agricultural Research Council – Livestock Business Division: Animal Production. Available online: http://www.sapork.biz/the-use-of-prebiotics-and-probiotics in pigs-a-review.

Meng QW, Yan L, Ao X, Zhou TX, Wang JP, Lee JH and Kim IH 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. J Anim Sci. 88(10): 3320-3326.

Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert J-M and Dousset X 2013. *Lactobacillus salivariu*s: bacteriocin and probiotic activity. Food Microbiol. 36(2): 296-304.

Murry A, Hinton A and Buhr R 2006. Effect of botanical probiotic containing lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. Int J Poult Sci. 5(4): 344-350.

Nataro JP and Kaper JB 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11(1): 142-201.

Neville B and O'Toole P 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. Future Microbiol. 5(5): 759-774.

Nicolae C, Dan D, Ioan MP, Deirdre S, Lavinia Ş, Călin J and Billy B 2010. The Effect of Probiotics on Animal Health (REVIEW). Anim Sci Biotechnol. 43: 35-41.

Oelschlaeger TA 2010. Mechanisms of probiotic actions–a review. Int J Med Microbiol. 300(1): 57-62.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A and Galvez J 2005. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. World J Gastroenterol. 11(33): 5185-5192.

Pieper R, Janczyk P, Schumann R and Souffrant W 2006. The intestinal microflora of piglets around weaning with emphasis on lactobacilli. Arch Zootech. 9: 28-40.

Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, Korn U, Pieper B and Souffrant WB 2009. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866

before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. Int J Food Microbiol. 130(3): 227-232.

Pluske JR, Hampson DJ and Williams IH 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livest Prod Sci. 51(1): 215-236.

Robb EJ, Bryson WL, Chester Jr ST and Dame KJ 2003. Efficacy of ceftiofur sodium for the control of mortality in neonatal pigs orally inoculated with K88 (F4) enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Swine Health Prod. 11(1): 7-11.

Rondón AJ, Ojito Y, Arteaga FG, Laurencio M, Milián G and Pérez Y 2013. Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* C 65 on productive and health indicators of lactating piglets. Cuban J Agric Sci. 47: 401-407.

Rooke J and Bland I 2002. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. Livest Prod Sci. 78(1): 13-23.

Rubio LA, Ruiz R, Peinado MJ and Echávarri A 2010. Morphology and enzymatic activity of the small intestinal mucosa of Iberian pigs as compared with a lean pig strain. J Anim Sci. 88(11): 3590-3597.

Salih N, Hutari A, Gaseem W and Yusoff W 2009. Maximization of Growth and Storage of Locally Isolated *Lactobacillus Salivarius* Subsp. *Salivarius* with High Stability and Functionality. 25th Southern Biomedical Engineering Conference 2009, 15–17 May 2009, Miami, Florida, USA. 175-178.

Sanders ME 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis. 46(2): S58-S61.

SAS 2002 SAS/SAT Guide for personal computers. 9.00 ed, SAS Inst., Inc., Carry, NC

Savino F, Bailo E, Oggero R, Tullio V, Roana J, Carlone N, Cuffini A and Silvestro L 2005. Bacterial counts of intestinal *Lactobacillus* species in infants with colic. Acta Pediatr Suppl. 16(1): 72-75.

Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M and Nanno M 2009. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. Immunol. 128: 858-869.

Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K and Hirata H 2008. Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Periodontol. 35(10): 897-905.

Shirkey T, Siggers R, Goldade B, Marshall J, Drew M, Laarveld B and Van Kessel A 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. Exp Biol Med. 231(8): 1333-1345.

Simon O, Vahjen W and Scharek L 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics. Adv pork Prod. 16: 161-167.

Sona G 2012. Differences in the development of the small intestine between gnotobiotic and conventionally bred piglets. In: New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology. In Tech, Croatia.

Suo C, Yin Y, Wang X, Lou X, Song D, Wang X and Gu Q 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. BMC Vet Res. 8(1): 89.

Swords WE, Wu CC, Champlin FR and Buddington RK 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. Biol Neonate. 63(3): 191-200.

Takahashi S, Egawa Y, Simojo N, Tsukahara T and Ushida K 2007. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. J Gen Appl Microbiol. 53(6): 325-332.

Takeda K and Akira S 2005. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol. 17(1): 1-14.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity. 11(4): 443-451.

Van Zijderveld F, Anakotta J, Brouwers R, Van Zijderveld A, Bakker D and De Graaf F 1990. Epitope analysis of the F4 (K88) fimbrial antigen complex of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies. Infect Immun. 58(6): 1870-1878.

Vanderpool C, Yan F and Polk DB 2008. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 14(11): 1585-1596.

Varley MA and Wiseman J 2001. The weaner pig: Nutrition and management. CABI Publishing, USA.

Vasala A, Panula J and Neubauer P 2005. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms. J Biotechnol. 117(4): 421-431.

Veerappan GR, Betteridge J and Young PE 2012. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep. 14(4): 324-333.

Veizaj-Delia E, Piu T, Lekaj P and Tafaj M 2010. Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. Livest Sci. 134(1): 249-251.

Wee Y-J, Kim J-N, Yun J-S and Ryu H-W 2005. Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. RKY2. Biotechnol Bioprocess Eng. 10(1): 23-28.

Wells JM 2011. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. Microb Cell Fact. 10(1): 1-15.

World Health Organization 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Yang F, Hou C, Zeng X and Qiao S 2015. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. Pathogens. 4(1): 34-45.

Yoshida Y, Tsukahara T and Ushida K 2009. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lq80 and Megasphaera elsdenii iNP-001 induces efficient recovery from mucosal atrophy in the small and the large intestines of weaning piglets. Anim Sci J. 80(6): 709-715.

Yu H, Wang A, Li X and Qiao S 2008. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. J Anim Feed Sci. 17(1): 61-69.

Zeth K 2012. Structure and uptake mechanism of bacteriocins targeting peptidoglycan renewal. Biochem Soc Trans. 40(6): 1560-1565.

Zhang J, Deng J, Wang Z, Che C, Li Y-f and Yang Q 2011. Modulatory effects of *Lactobacillus salivarius* on intestinal mucosal immunity of piglets. Curr Microbiol. 62(5): 1623-1631.

Zhang L, Xu Y-Q, Liu H-Y, Lai T, Ma J-L, Wang J-F and Zhu Y-H 2010. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. Vet Microbiol. 141(1): 142-148.

Zhang W, Berberov EM, Freeling J, He D, Moxley RA and Francis DH 2006. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. Infect Immun. 74(6): 3107-3114.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวหฤทัย สายัณห์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2534 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตอุดมศักดิ์ เมื่อปีการศึกษา 2555 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2556

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University