รายงานการวิจัย เรื่อง

การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทย

Antimicrobial resistance and its transferability of commercial probiotic strains in Thailand

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น*

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ**

ธราดล เหลืองทองคำ*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2551

* คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

รายงานการวิจัย เรื่อง

การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทย

Antimicrobial resistance and its transferability of commercial probiotic strains in Thailand

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น*

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ**

ธราดล เหลืองทองคำ*

กุมภาพันธ์ 2551

* คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2550 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา รศ.น.สพ.ดร. เกรียงศักดิ์ พูนสุข และนางสุภาพ เหมืองแก้ว ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ช่วยเหลือด้านเทคนิคในห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อและอนุเคราะห์ตัวอย่าง รวมถึงบริษัทเอกชน (ซึ่งไม่สามารถระบุนามในที่นี้ได้) ที่อนุเคราะห์สารเสริมชีวนะ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตปริญญาโท ผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014128
วัน, เดือน, ปี 6 พ.ค. 52

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
สพ.ญ.ดร. พรเพ็ญ พัฒนโสภณ
ผศ.น.สพ.ดร. ธราดล เหลืองทองคำ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กุมภาพันธ์ 2551

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยา ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 13 ชนิด โดยแบคทีเรียเป้าหมายสำหรับการศึกษาครั้งนี้คือ แลคโตบาซิลลัส บาซิลลัสและเอ็นเทอโรค็อคคัส ทำการตรวจหาการปรากฏของยีนควบคุมการดื้อยาเตตร้าซัยคลิน (ยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetW*) ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซม์ (ยีน *aadE*) ยาอิริโทรมัยซิน (ยีน *ermA*, *ermB*, *ermC*) และยาแวนโคมัยซิน (ยีน *vanA*, *vanB*, *vanC*) ผลการวิจัยพบว่า ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีข้อบกพร่องอย่างน้อย 1 อย่าง ปัญหาที่พบมากที่สุดคือ ชนิดของเชื้อไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลาก ตรวจพบการปรากฏของพลาสมิดในเชื้อ *Lactobacillus* (22%) และ *Bacillus* (2.5%) ไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาในเชื้อเหล่านี้และพบยีน *vanA* ในเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 1 isolate และยีน *tetW* และ *vanA* ในเชื้อ *Bacillus* จำนวน 1 isolate เชื้อทั้ง 2 ตัวนี้ไม่มี plasmid ดังนั้นจึงไม่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธี conjugation รวมทั้งพบยีน *vanA* ในเชื้อ *Enterococcus faecium* (33%, 2 ใน 6 isolates) ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Title Antimicrobial resistance and its transferability of commercial probiotic strains in Thailand

Investigators Dr. Rungtip Chuanchuen
Dr. Pornpen Pathanasophon
Dr. Taradol Luengtongkum

Year February 2008

Abstract

Genetics of antibiotic resistance, species and numbers of probiotic bacteria isolated from 13 probiotic products that are commercially available for food animals in Thailand were determined. The bacteria of interest in this study included *Lactobacillus*, *Bacillus*, and *Enterococcus*. The presence of genes encoding resistance to tetracycline (*tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetW*), aminoglycosides (*aadE*), erythromycin (*ermA*, *ermB*, *ermC*) and vancomycin (*vanA*, *vanB*, *vanC*) was investigated. The results revealed that each product has at least one flaw. The most common problem was the wrong nomenclature. Plasmid was identified in both *Lactobacillus* (22%) and *Bacillus* (2.5%) but antibiotic resistance transferability was not observed. One *Lactobacillus* carried *vanA* as one *Bacillus* harbored both t*etW* and *vanA*. Sine these two strains did not have plasmid, their resistance genes could not be transferred via conjugation. In addition, the *vanA* genes was determined in *Enterococcus faecium* (33%, 2/6 isolates)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
บทนำ	1
การศึกษาและผลงานที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	6
ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย	7
ระยะที่ 2 แยกและตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria ขั้นต้น ด้วยวิธีทางชีวเคมี	8
ระยะที่ 3 ตรวจพิสูจน์ probiotic bacteria ด้วยวิธีทางอะณูชีววิทยา	9
ระยะที่ 4 หาการปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli*	11
ระยะที่ 5 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	11
ระยะที่ 6 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา	13
ระยะที่ 7 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา	14
ผลการวิจัย	15
การแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria	15
จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในสารเสริมชีวนะ	18
การปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli*	19
ความไวต่อยาปฏิชีวนะ	19
ความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา	24
การปรากฏของยีนดื้อยา	27
อภิปรายผลการวิจัย	28
สรุปผลการวิจัย	33
ข้อเสนอแนะ	34
ประโยชน์ในการนำไปใช้	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้าที่
ตารางที่ 1	รายละเอียดของ Probotics สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่ระบุไว้บนฉลาก	7
ตารางที่ 2	primers ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้	10
ตารางที่ 3	ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย	12
ตารางที่ 4	species ของ *Lactobacillus* ที่แยกได้	15
ตารางที่ 5	species ของ *Bacillus* ที่แยกได้	16
ตารางที่ 6	การวิเคราะห์ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะ	19
ตารางที่ 7	ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus*	21
ตารางที่ 8	ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ *Bacillus*	22
ตารางที่ 9	อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (%) ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus*	23
ตารางที่ 10	ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* ที่มี plasmid	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

		หน้าที่
รูปที่ 1	PCR products ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* ด้วยเทคนิค multiplex PCR	15
รูปที่ 2	รูปแบบ ADRDR ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Bacillus* ด้วยเทคนิค multiplex PCR	17
รูปที่ 3	PCR products ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* ด้วยเทคนิค multiplex PCR	18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

A_{600nm}	absorbance at 600 nm
AMP	ampicillin
Ap_{100}	ampicillin 100 µg/ml
ASS	Ammonium salt sugar
BGA	Brillient Green Agar
bla	β-lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
BPW	Buffered Peptone Water
BS	Broth sugar
°C	degree(s) Celcius
Cb	carbenicillin
CFU	Colony Forming Unit
CHP	chloramphenicol
Cip	ciprofloxacin
cm	centimeter(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
E.	*Escherichia*
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
Ery	Erythromycin
GEN	gentamicin
h	hour(s)
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
Km	kanamycin
l	liter(s)
LB	Luria-Bertani medium
log	logarithic growth phase
Mb	megabasepairs
M	molar
mM	millimolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MDR	multidrug resistance
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
MRS	de Mans Rogosa and Sharpe Agar
MYP	Manitol Egg Yolk Polymyxin-B Agar
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
P.	*Pseudomonas*
PCR	polymerase chain reaction
PSD	Peptone Saline Diluting fluid
r	resistance/resistant
Rif	Rifampicin
Rif_{32}	Rifampicin 32 µg/ml
s	sensitive/susceptible
S.	*Salmonella*
sec	seconds
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF	SF-Streptococcus
STR	streptomycin
TET	tetracycline
tet	tetracycline-resistance encoding gene
TRI	Trimethoprim
u	unit(s)
µl	microliter
µM	micromolar
µg	microgram(s)
v/v	volume by volume
WT	wild-type
Van	vancomycin
VP	Voges Proskauer
%	percentage

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในปัจจุบัน เชื้อดื้อยาถูกจัดว่าเป็นโรคอุบัติใหม่ (Emerging disease) และเป็นปัญหาสำคัญทั้งด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจระดับโลก สร้างความเสียหายทั้งต่อวงการแพทย์และสัตวแพทย์ ปัญหานี้ทวีความซับซ้อนมากขึ้นเพราะเชื้อมักดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) สามารถพัฒนาการดื้อข้าม (cross resistance) ไปยังยาชนิดอื่นๆ รวมถึงยาที่ใช้ในการรักษาโรคในคนและยังเป็นตัวการสำคัญที่ถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้อต่างสายพันธุ์ด้วย (30) ซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า สาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาคือ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างขาดความระมัดระวังและเกินความจำเป็นทั้งในการรักษาผู้ป่วย การเลี้ยงสัตว์และการรักษาสัตว์และประเด็นที่วิพากษ์วิจารณ์กันอย่างมากคือ การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภค ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อแบคทีเรียพัฒนาการดื้อยาปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ สิ่งแวดล้อมและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne pathogens) ได้แก่ *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* และ *Campylobactor jejuni* เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาและปัญหาเชื้อดื้อยาได้กลายเป็นประเด็นสำคัญทางการค้าระหว่างประเทศ เช่น สหภาพยุโรปห้ามใช้ avoparcin ผสมในอาหารสัตว์ในปี 1996 และเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมดเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ในปัจจุบัน เป็นต้น Codex ได้ออก code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance และเป็นไปได้ว่าอาจมีการยกปัญหาเชื้อดื้อยาและการควบคุมเชื้อดื้อยาภายในประเทศมาใช้ในการกำหนดเงื่อนไขทางการค้าระหว่างประเทศในอนาคต (57) ประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ส่งออกจำเป็นต้องปฏิบัติตามและเตรียมพร้อมเพื่อรับมือกับการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นเช่นกัน

การใช้สารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก ในขณะที่ยังไม่มีสิ่งทดแทนยาปฏิชีวนะชนิดใดที่ออกมามีบทบาทและประสิทธิภาพอย่างชัดเจน ประกอบกับการสนับสนุนการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์ ทำให้สารเสริมชีวนะ (Probiotics) เพิ่มความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆ (14) ในปัจจุบัน การศึกษาวิจัยและเทคโนโลยีการผลิตสารเสริมชีวนะก้าวหน้าไปมาก ทั้งการผลิตและการใช้สารเสริมชีวนะมีแนวโน้มสูงขึ้น มีการนำจุลินทรีย์หลายสเตรนมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะจำหน่ายเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์ บางผลิตภัณฑ์มีจุลินทรีย์มากถึง 10 สายพันธุ์ ซึ่งรวมถึง aerobes, anaerobes และ spore-forming bacteria (ข้อมูลจาก Veterinary and animal health products directory 2003-2004)

ในสหภาพยุโรป สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเข้มงวดของ Regulation 1831/2003 EU ตามแนวทางการทดสอบที่เสนอโดย the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) (4, 42) ซึ่งเน้นการทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์เอง คนและสิ่งแวดล้อม โดยมีประเด็นหลักอยู่ที่การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ (38) ขณะนี้ยังไม่มีการกำหนดสเตรนของเชื้อที่เป็นสารเสริมชีวนะและการยอมรับสารเสริมชีวนะของ SCAN จะขึ้นกับข้อมูลวิทยาศาสตร์จากผู้ผลิตและการไม่เคยมีรายงานถึงอันตรายที่เกิดจากเชื้อนั้น (42) สาเหตุสำคัญที่ SCAN ควบคุมสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อย่างเข้มงวด คือ จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะอาจเป็นเชื้อดื้อยาแบบที่สามารถถ่ายทอดได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา

Wagner และ Cerniglia (2005) พบว่าเชื้อที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะดื้อต่อ tetracycline, erythromycin, penicillin, vancomycin, และ tylosin (43) ก่อนหน้านี้ Danielson และ Wind (2003) พบว่า *Lactobacillus* spp. ดื้อต่อ tetracycline, vancomycin, fluoroquinolones, fusidic acid และ clindamycin โดยที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อ tetracycline ได้ ดังนั้นการใช้สารเสริมชีวนะที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบอย่างรอบคอบโดยเฉพาะการถ่ายทอดยีนดื้อยา อาจกลายเป็นตาบสองคมที่สร้างปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการทดสอบความไวต่อยาด้วยการหาค่า MIC เท่านั้นไม่เพียงพอต่อการยืนยันความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (8)

ในขณะที่สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้บางตัวไม่ได้รับการรับรองความปลอดภัยจาก SCAN และได้รับเพียงการตรวจหาเชื้อก่อโรคเท่านั้น รวมทั้งไม่มีการตรวจว่าปลอดภัยจากเชื้อดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาได้หรือไม่ ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศ ซึ่งยังไม่มีการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยอย่างจริงจังและเป็นระบบ แต่จะทำการตรวจสอบเพียงว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคหรือไม่เท่านั้น นอกจากนี้การศึกษาเรื่องสารเสริมชีวนะในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้านประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะในแง่ของความเป็นไปได้ที่จะเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา

จากการที่การใช้สารเสริมชีวนะในการเลี้ยงสัตว์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ คณะผู้วิจัยเล็งเห็นความสำคัญถึงการศึกษาความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นจึงวางวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในครั้งนี้ คือ

1. เพื่อตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ที่ใช้ เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์
2. ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะที่ดื้อยาและสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาได้

คณะผู้วิจัยวางแผนทำการวิจัยเพื่อตรวจสอบคุณภาพด้านความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายเพื่อการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย โดยทำการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาตามแนวทางปฏิบัติของ SCAN ซึ่งครอบคลุมถึง i) การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา ii) การยืนยันว่าการดื้อยาเป็นแบบ intrinsic หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ไม่มีการถ่ายทอด iii) การทดสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยา (Transferability test) และ iv) การตรวจหาการปรากฏของ known resistance genes ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้จะทำการยืนยันชนิดของเชื้อที่ดื้อยาด้วยวิธี PCR เพราะจุลินทรีย์เสริมชีวนะมีความคล้ายคลึงกันมากในระดับชีวเคมี การระบุชนิดของเชื้อด้วย conventional methods ไม่มีความแม่นยำเพียงพอ (8) ซึ่งการใช้วิธีทดสอบที่ได้มาตรฐานร่วมกับการทดสอบอย่างมีระบบและหลักการส่งผลให้ผลการวิจัยมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายในประเทศไทย จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ รวมถึงผู้บริโภคอาหารที่มาจากเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อมด้วย

การศึกษาและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้ให้นิยามของสารเสริมชีวนะไว้ว่า สารเสริมชีวนะ คือ จุลินทรีย์มีชีวิตที่ให้เข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการกินในปริมาณที่เหมาะสมแล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย (17, 36) จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจเป็น รา ยีสต์ หรือแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีคุณสมบัติที่ช่วยให้สัตว์มีสุขภาพดี สามารถย่อยอาหารและนำอาหารไปใช้ได้ดีขึ้น เมื่อร่างกายได้รับจุลินทรีย์เสริมชีวนะเข้าไปจุลินทรีย์เหล่านี้จะแย่งอาหารและพื้นที่ผิวของลำไส้กับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เป็นผลให้จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคลดลง ส่วนจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะบางชนิดที่สามารถสร้างกรด เช่น แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) จะทำให้ความเป็นกรดด่า ของลำไส้ลดลง เป็นผลให้สภาพแวดล้อมภายในลำไส้ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเชื้อก่อโรคและทำให้เชื้อก่อโรคตายได้ในที่สุด นอกจากนี้จุลินทรีย์หลายชนิดยังสามารถสร้างวิตามินและเอนไซม์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ได้ (34) แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ แบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus* spp. เช่น *L. plantarum L. acidophilus L. rhamnosus* แบคทีเรียจำพวก *Enterococcus* spp. เช่น *E. faecium* และแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* var *toyoi B. licheniformis B.subtilis* Tannock, 1998 (ซึ่งสามารถเตรียมได้จากแบคทีเรียบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด (35) แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะมากที่สุด คือ *Lactobacillus* (47) ในสหภาพยุโรป *Lactobacillus* ชนิดที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้ คือ *L. farciminis L. rhamnosus L. casei* และ *L. plantarum* โดยเชื้อที่จะใช้เป็นสารเสริมชีวนะต้องไม่มียีนดื้อยาบน plasmid ที่สามารถถ่ายทอดได้ (37) นอกจากนี้ *Enterococus* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ ดังนั้นการนำ *Enterococcus* มาใช้เป็นสารเสริมชีวนะจึงต้องให้ความสำคัญในการระบุสปีชีส์ที่ถูกต้องเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (7, 9, 13) แบคทีเรียอีกชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ คือ *Bacillus* ซึ่งในสหภาพยุโรป อนุญาตให้ใช้ *B. cereus* var *toyoi* และ *B. subtilis* เป็นสารเสริมชีวนะได้ โดยให้เหตุผลว่าเชื้อทั้ง 2ชนิดนี้ปลอดภัยต่อสัตว์เพราะไม่สร้างสารพิษและยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดยีนดื้อยาได้

ข้อกำหนดและการควบคุมการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์นั้นจะต้องมีคุณสมบัติตามมาตรฐาน Generally Regarded As Safe (GRAS) ตามข้อกำหนดของ Food and Drug Administration (FDA) ของสหรัฐอเมริกา U.S. FDA, 2002 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์

ในยุโรป มีการควบคุมการผลิตและการใช้สารเสริมชีวนะอย่างเข้มงวดโดย SCAN ซึ่งจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะในสัตว์นั้นต้องผ่านการทดสอบตามแนวทางที่ระบุใน Regulation (EC) No. 1831/2003 ที่กำหนดว่าการใช้สารเสริมชีวนะในสัตว์นั้นต้องเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยและไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยมีประเด็นหลักอยู่ที่การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ ซึ่งการ

ยอมรับสารเสริมชีวนะของ SCAN จะขึ้นกับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์จากผู้ผลิตและการที่ไม่เคยมีรายงานถึงอันตรายที่เกิดจากเชื้อนั้น (42) การตรวจสอบความปลอดภัยสารเสริมชีวนะโดย SCAN ประกอบด้วย การตรวจหารูปแบบการดื้อยา การตรวจหายีนดื้อยา และการถ่ายทอดยีนดื้อยา ต่อมาในปี 2005 European Food Safety Authority ได้ระบุให้มีการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่มีแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบโดยให้ความสำคัญเกี่ยวกับพันธุกรรมการดื้อยาของเชื้อนั้นๆ และเน้นการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียเสตรนต่างๆ การประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยา รวมถึงการควบคุมคุณภาพ บรรจุภัณฑ์ และข้อมูลบนฉลากของผลิตภัณฑ์เสริมชีวนะ ซึ่งข้อมูลบนฉลากจะต้องแสดงชนิดของเชื้อ จำนวนเชื้อ (cfu/gram) วิธีการใช้ ระยะการเก็บ และวันหมดอายุ ทั้งนี้ข้อกำหนดของ SCAN และ EFSA มีจุดประสงค์เดียวกัน คือ เพื่อควบคุมความปลอดภัยและการใช้สารเสริมชีวนะในสัตว์และมนุษย์

สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทยอยู่ภายใต้การควบคุมของกรม ปศุสัตว์ โดยสารเสริมชีวนะจัดเป็นหนึ่งในวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ .2525 ซึ่งผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ได้นั้นต้องขึ้นทะเบียนกับกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดให้สารเสริมชีวนะเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ โดยแบคทีเรียที่ได้รับอนุญาตให้ผลิตเป็นสารเสริมชีวนะมีทั้งหมด 42 ชนิด ซึ่งอาจใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ โดยใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปเพื่อจำหน่ายในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า $1x10^5$ CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้นั้นต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ ในกรณีที่ต้องการหาเชื้อสายพันธุ์ใหม่มาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ ต้องมีการพิสูจน์ให้เห็นถึงความปลอดภัยอย่างชัดเจนเสียก่อน อย่างไรก็ตามยังไม่มีการกำหนดแนวทางการทดสอบที่ชัดเจน

รายงานการดื้อยาในแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะและปัญหาที่เกี่ยวข้อง

จากศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ lactic acid bacteria ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายในประเทศแถบยุโรปจำนวน 55 ผลิตภัณฑ์ โดยคณะผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อได้ 187 สเตรน ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา kanamycin, vancomycin, tetracycline, penicillin G และ chloramphenicol คิดเป็น 79, 65, 26, 23 และ 11% ตามลำดับ โดยที่ 68.4% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน (multiple antibiotic resistance, MDR) (40)

จากการศึกษาของ Danielsen และ Wind (2003) พบว่า *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้นดื้อต่อ vancomycin ในระดับสูง นอกจากนี้ *Lactobacillus* บางสปีชีส์ยังดื้อต่อ bacitracin, cefoxitin , ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/ sulphamethoxazole และ vancomycin โดยพันธุกรรมอยู่แล้ว

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* อย่างน้อย 25 สปีชีส์ มี plasmid โดยธรรมชาติและพบว่า เชื้อสเตรนหนึ่งสามารถมี plasmid ได้หลายชนิด ถ้า plasmid เหล่านี้มียีน ดื้อยาก็จะเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้ ที่ผ่านมามีรายงานการตรวจพบ R-plasmids ที่มียีนดื้อยา tetracycline

erythromycin, chloramphenicol, macrolide-lincomycin และ streptomycin ใน *L. reuteri* (3, 22, 28, 41) *L. fermentum* (15, 20) *L. acidophilus* (Vescovo et al., 1982) และ *L.* plantarum (1, 10) ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ เนื้อดิบและอุจจาระด้วย (44)

จากการศึกษาการดื้อยาของ *Bacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะจำนวน 5 ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศแถบยุโรป พบว่า *B. cereus* สามารถผลิตเอนไซม์ ß-lactamase ได้ ทำให้ดื้อต่อ penicillin, ampicillin และ cephalosporins นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังดื้อต่อ chloramphenicol และ tetracycline อีกด้วย และ *B. cereus* บางสเตรนที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้นสามารถถ่ายทอดยีน *tetB* ซึ่งควบคุมการดื้อต่อ tetracycline ได้ ในทำนองเดียวกัน พบว่า *B. cereus* สามารถถ่ายทอดยีนที่ดื้อต่อ tetracycline ไปยัง *B. subtilis* และยีนสามารถคงอยู่ได้ (5) นอกจากนี้ SCAN (2000) ยังเสนอว่าการใช้ *B .licheniformis* เป็นสารเสริมชีวนะนั้นไม่ปลอดภัย เนื่องจากเสี่ยงต่อการถ่ายทอดการดื้อต่อ erythromycin (18)

Enterococcus มีคุณสมบัติดื้อยาโดยพันธุกรรมอยู่แล้ว โดยดื้อต่อ cephalosporins, ß-lactams และ sulphonamides ในระดับสูงและดื้อต่อ clindamycin, aminoglycosides ในระดับต่ำ (31, 32) นอกจากนี้เชื้อยังพัฒนาการดื้อยาโดยการรับ plasmid หรือ transposons จากเชื้ออื่น ทำให้ดื้อต่อ clindamycin aminoglycosides ได้ในระดับสูง และดื้อต่อ chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, ß-lactams fluoroquinolones และ glycopeptides ได้ (26) ต่อมามีรายงานการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ *Enterococcus* ด้วยวิธี conjugation โดยใช้ *E. faecium* สเตรนที่มียีน *vanA* เป็นตัวให้ (donor) และใช้ *E. faecium* สเตรนที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะเป็นตัวรับ (recipient) พบว่า *E. faecium* สามารถรับยีน *vanA* ได้ และยังพบอีกว่าเชื้อนั้นถูกโน้มนำให้ดื้อข้ามต่อ streptomycin และ rifampicin ได้อีกด้วย (29)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มี 6 ระยะ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

ระยะที่ 2 แยกและตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria ขั้นต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี

ระยะที่ 3 ตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria ด้วยวิธีทางอะณูชีววิทยา

ระยะที่ 4 หาการปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli*

ระยะที่ 5 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ระยะที่ 6 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

ระยะที่ 7 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา

ในการวิจัยครั้งนี้ให้ความสำคัญกับเชื้อ 3 ชนิด คือ *Lactobacillus, Bacillus* และ *Enterococcus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

เก็บ Probotics สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีจำหน่ายในประเทศไทย จำนวน 13 ชนิด (ในที่นี้คำว่า ชนิด หมายถึง ชื่อการค้า) ชนิดละ 2 ตัวอย่าง โดยจัดซื้อหรือขอรับการอนุเคราะห์จากตัวแทนจำหน่าย เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าจำนวน 4 ชนิดและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเองในประเทศจำนวน 9 ชนิด ผลิตภัณฑ์ 11 ชนิดเป็นชนิดแห้ง อีก 2 ชนิด คือ ผลิตภัณฑ์หมายเลข 2 และ 7 เป็นชนิดเหลว ในการเก็บตัวอย่างจะเก็บทั้งถุงหรือขวดโดยไม่เปิดภาชนะบรรจุ ถ้าจำเป็นต้องแบ่งเก็บ จะใช้เทคนิคปลอดเชื้อและทุกตัวอย่างจะถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการภายใน 1 วันหลังถูกเก็บ เก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องและทำการทดสอบภายใน 7 วันหลังมาถึงห้องปฏิบัติการ รายละเอียดของแต่ละผลิตภัณฑ์ที่ระบุไว้บนฉลากแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดของ Probotics สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่ระบุไว้บนฉลาก

Product no.	Information given on labels	
	Strain	Number (CFU/g or CFU/ml)
1	*B. subtilis*	$1x10^6$
2	*B. subtilis*	$1x10^6$
3	*B. subtilis*	$5x10^7$ - $3x10^9$
4	*B. licheniformis*	$1x10^7$
	B. subtilis	$1x10^7$
	S. faecium	$1x10^5$
5	*L. acidophilus*	$1x10^{10}$
	L. plantarum	$1x10^{10}$
	S. faecium	$1x10^{10}$
	B. subtilis	$1x10^{10}$
	B. licheniformis	$1x10^{10}$
6	*Bacillus* spp.	$1x10^6$
	L. plantarum	$1x10^6$
	S. faecium	$1x10^5$
7	*Bacillus* spp.	$1x10^6$
	L. plantarum	$1x10^6$
8	*L. acidophilus*	$1x10^6$
	L. plantarum	$1x10^6$
	B. subtilis	$1x10^6$
	B. licheniformis	$1x10^6$
9	*B. subtilis*	$1x10^9$
	L. acidophilus	$1x10^4$
10	*L. acidophilus*	$1.67x10^8$
	E. faecium	$1.67x10^8$
11	*B. subtilis*	$1x10^9$
	L. acidophilus	$1x10^4$
12	*B. subtilis*	$1x10^9$
	B. licheniformis	$1x10^9$
	E. faecium	$1x10^7$
13	*L. casei*	$1x10^9$
	L. plantarum	$1x10^9$
	L. brevis	$1x10^9$
	S. faecium	$1x10^9$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 2 แยกและตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria

ในการเตรียมตัวอย่าง สำหรับสารเสริมชีวนะชนิดแห้ง ชั่งน้ำหนักสารเสริมชีวนะ 20 กรัมและนำมาผสมกับสารละลาย Peptone Saline Diluting (PSD) ปริมาตร 180 มล.นำเข้า ส่วน probiotics ชนิดน้ำ ละลาย probiotics ปริมาตร 1มล. ในสารละลาย PSD ปริมาตร 9 มล. ทำการเจือจางเชื้อแบบ 10-fold จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3 ความเข้มข้นมาเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจหา *Lactobacillus* ด้วยวิธี pour plate ตามที่อธิบายใน ISO15214 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ deMans Rogosa and Sharpe (MRS) agar อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 24-48 ชม. สำหรับ *Enterococcus* ใช้วิธี pour plate ตามที่อธิบายใน European Commuity Project SMT4 CT98-2235 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SE-Streptpcoccus agar อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 24-48 ชม. และสำหรับ *Bacillus* ใช้วิธี spread plate ตามที่อธิบายใน ISO7932 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Manitol Egg Yolk Polymyxin-B (MYP) agar อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 24 ชม. ในการวิจัยครั้งนี้ทำการหาเชื้อที่ความเข้มข้นละ 2 plates (duplicates) ตรวจนับจำนวนเชื้อใน plate ที่มีจำนวนเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี หน่วยเป็น colony forming units/ gram (CFU/g) หรือ colony forming units/ mililitters (CFU/ml)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด (selective media) จึงสามารถคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะเพื่อเก็บไว้สำหรับการศึกษาต่อไป โดยลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังนี้

2.1 ลักษณะจำเพาะของ *Lactobacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

ส่วนที่เจริญภายในอาหาร โคโลนีจะมีขนาดเล็กมาก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ม.ม. ส่วนที่เจริญบนอาหาร โคโลนีจะมีขนาดเล็กมาก เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ม.ม. สีไม่ขุ่นมาก

2.2 ลักษณะจำเพาะของ *Bacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar

แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีสีแดงหรือเหลือง โดยโคโลนีมีลักษณะตามสายพันธุ์ คือ *B. cereus* มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 ม.ม. สีแดง แบนราบ ขอบไม่เรียบ มีฝ้าขาวขุ่นรอบๆ *B. mycoides* มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 ม.ม. สีเหลืองหรือชมพูอ่อน แบนราบ ขอบไม่เรียบ มีกิ่งก้านสาขา *B. subtilis* มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 ม.ม. สีเหลือง เป็นเมือกเล็กน้อย ต่อมาผิวจะแห้ง ยกตัวม้วนและขรุขระ *B. licheniformis* มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 ม.ม.สีเหลืองหรือขาวใส เป็นเมือกหนา ต่อมาผิวจะแห้ง

2.3 ลักษณะจำเพาะของ *Enterococcus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SE-Streptpcoccus agar

แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* มีขนาดเล็กเท่ากับหัวข็มหมุด โดย *E. facalis* มีสีแดงเข้ม ส่วน *E. faecium* มีสีชมพูอ่อน

อย่างไรก็ตาม บางครั้งแบคทีเรียเป้าหมายอาจมีลักษณะที่แตกต่างออกไปเล็กน้อย ดังนั้นจึงเก็บโคโลนีที่มีลักษณะใกล้เคียงด้วย โดยเก็บลักษณะละ 1-5 โคโลนี นำทุกๆโคโลนีที่เลือกเก็บมาย้อมด้วยสีแกรม

หลังจากนั้นทำการตรวจพิสูจน์เชื้อเบื้องต้นด้วยการตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด ตามวิธีที่อธิบายใน Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria ดังนี้

Lactobacillus: oxidase test, catalase test, ntrate reduction test และ fermentation of arabinose, galatose, lactose, maltose, manitol, raffinose และ sorbitol

Bacillus: oxidase test, catalase test, Voges Proskauer (VP) test, urease test, nitrate reduction test และ fermentation of galactose, mannose, raffinose และ xylose

Enterococcus: oxidase test และ catalase test

โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* แสดงไว้ในภาคผนวก

ระยะที่ 3 ตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อ Probiotic bacteria ด้วยวิธีทางอะณูชีววิทยา

สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* and *Enterococus* นำเชื้อที่ตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วมาตรวจยืนยันด้วยเทคนิค multiplex PCR assay โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ genus และ species (ตารางที่ 3) ทดสอบความจำเพาะของ primers โดยการสกัด PCR products ด้วย QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)และส่งไปถอดรหัสพันธุกรรมที่ Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) เตรียม DNA ด้วย whole cell boiled lysate และ genomic DNA เตรียมโดยใช้ชุดทดสอบ QuickExtract™ (Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA) ส่วนเชื้อ *Bacillus* ยืนยันด้วยเทคนิค amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) ตามวิธีที่อธิบายโดย Wu และ คณะในปี 2006 (46) โดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA และตัด PCR products ด้วยเอนไซม์ *Alu1* และ *TaqI* (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) ตรวจสอบ the ARDRA patterns บน 1.5 -2% agarose gel สำหรับปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Eppendorf® MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 primers ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

Primers	Sequence (5'-3')	PCR type	Product size (bp)	ที่มา
Lactobacillus				
R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTTCA	Genus-specificity	Variable	(33)
LbLMA1-rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC			(11)
IDL03R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA		-	(25)
IDL04L	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC		-	(25)
IDL11F	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG	*L. casei group*	727	(25)
IDL22R	AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC	*L. acidophilus*	606	(25)
IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	*L. delbrueckii*	184	(25)
IDL42R	ATTTCAAGTTGAGTCTCTCTCTC	*L. gasseri*	272	(25)
IDL52F	ACCTGATTGACGATGGATCACCAGT	*L. reuteri*	1105	(25)
IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAAACTGC	*L. plantarum*	428	(25)
IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTGCTTGC	*L. rhamnosus*	448	(25)
Enterococcus				
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	Genus-specificity	112	(23)
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	*E. faecalis*	360	(21)
FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG			
FM1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	*E. faecium*	215	(21)
FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA			
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	*E. gallinarum*	173	(21)
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	*E. casseliflavus*	288	(21)
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG			
HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	*E. hirae*	187	(21)
HI2	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG			
DU1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	*E. durans*	295	(21)
DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG			
Bacillus				
B-K1/F	TCACCAAGGCRACATGCG	All Bacillus	~1,114	(46)
B-K1R	CGTATTCACCGCGGCATG			
Resistance genes				
GyrAfw	CAMCGKCGKATTCTTTACGGAATG	QRDR of *gyrA*	-	(19)
GyrArw	TTRTTGATATCRCGBAGCATTTC			
ParCfw	TATTCYAAATAYATCATTCARGA	QRDR of *parC*	-	(19)
ParCrev	GCYTCNGTATAACGCATMGCCG			
aadEI	GCAGAACAGGATGAACGTATTCG	*aadE*	369	(24)
aadEII	ATCAGTCGGAACTATGTCCC			
tetKI	CAATACCTACGATATCTA	*tetK*	352	(24)
tetKII	TTGAGCTGTCTTGGTTCA			
tet(L)I	TGGTCCTATCTTCTACTCATTC	*tetL*	385	(45)
tet(L)II	TTCCGATTTCGGCAGTAC			
tet(M)I	GGTGAACATCATAGACACGC	*tetM*	401	(45)
tet(M)II	CTTGTTCGAGTTCCAATGC			
tet(O)I	AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC	*tetO*	1723	(24)
tet(O)II	CGGCGGGGTTGGCAAATA			
tet(S)I	ATCAAGATATTAAGGAC	*tetS*	573	(6, 16)
tet(S)II	TTCTCTATGTGGTAATC			
tet(W)-I	GGMCAYRTGGATTTYWTIGC	*tetW*	1187	(2)
tet(W)-II	TCIGMIGGIGTRCTIRCIGGRC			
vanA1	GGGAAAACGACAATTGC	*vanA*	-	(12)
vanA2	GTACAATGCGGCCGTTA			
vanB1	ATGGGAAGCCGATAGTC	*vanB*	-	(12)
vanB2	GATTTCGTTCCTCGACC			
vanC1	GGTATCAAGGAAACCTC	*vanC*	-	(12)
vanC2	CTTCCGCCATCATAGCT			
ermAI	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	*ermA*	645	(39)
ermAII	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT			
ermBI	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	*ermB*	639	(39)
ermBII	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
ermCI	TCAAAACATAATATAGATAAA	*ermC*	643	(39)
ermCII	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 4 ตรวจหาการปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli*

ตรวจหา *Salmonella* โดยใช้วิธีมาตรฐานของ Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella* (ISO 6579, 1993) โดยนำสารเสริมชีวนะ 10 กรัม หรือ 10 มล. ผสมกับ Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 90 มล. และนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 18±2 ชม. เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบบ 10-fold และเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 24 ชม.

สำหรับ *E. coli* ใช้วิธีที่อธิบายใน Microbiology general guidance for enumeration of presumptive *E. coli* most probable number technique (ISO 7251, 1993) โดยนำสารเสริมชีวนะ 10 กรัม หรือ 10 มล. ผสมกับสารละลาย PSD ปริมาตร 90 มล. ทำการเจือจางเชื้อแบบ 10-fold และเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methlene Blue Agar (EMB) อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 24 ชม.

ถ้าพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* และ *E. coli* จะทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บรักษา *Salmonella* และ *E. coli* ใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C และนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ การมี plasmid และความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาตามวิธีที่อธิบายในระยะที่ 6

ระยะที่ 5 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Two-fold agar dilution สำหรับ *Bacillus* ทำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) ตามวิธีมาตรฐานของ Clnical Laboratory Standard Intitute (CLSI) 2002 ส่วน *Lactobacillus* ทำการหาค่า MIC ตามวิธีที่อธิบายใน Klare et al (2005) และ Egeravrn et al (2007) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LAB susceptibility test medium ที่ประกอบด้วย Iso-Sensitest broth และ deMan-Rogosa-Sharpe broth ในอัตราส่วน 9:1 โดยอบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C ในที่มีออกซิเจน (aerobic environment) ในการวิจัยครั้งนี้ ใช้ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา (breakpoint) ที่กำหนดโดย SCAN เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 29212 ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบทั้งหมด 12 ชนิด (ตารางที่ 4) โดยใช้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (µg/ml)	breakpoint* (µg/ml)	
		Lactobacillus	*Bacillus*
1. ampicillin (AMP)	1, 2, 4, 8, 16	2	2
2. chloramphennicol (CHP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	16	16
3. ciprofloxacin (CIP)	0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16	4	1
4. erythromycin (ERY)	1, 2, 4, 8, 16, 32	4	4
5. gentamycin (GEN)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	1	8
6. kanamycin (KAN)	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	32	64
7. neomycin (NEO)	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	32	64
8. Rifampicin (RIF)	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	32	4
9. streptomycin (STR)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	16	64
10. tetracycline (TET)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	16	16
11. trimethoprim (TRI)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32	8
12. vancomycin (VAN)	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	4	4

* ความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยาที่กำหนดโดย SCAN

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 6 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

ในขั้นตอนนี้ เริ่มต้นด้วยการตรวจสอบว่า เชื้อทั้งหมดมี plasmid หรือไม่ โดยการสกัด plasmid ดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ *Bacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) broth ปริมาตร 5 มล. ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นปั่นแยกเซลล์จากเชื้อ 3.0 มล ใน eppendorf tubes ที่ความเร็ว 13000 x g เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 มล ละลาย pellets ใน ice cold solution A (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) 100 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex (หรืออาจละลายใน 100 µl ice cold 10 mg/ml lysozyme และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที) จากนั้นเติม สารละลาย B 200 µl i (0.2 N NaOH, 1% SDS เตรียมทันทีก่อนใช้) ผสมด้วยการกลับหลอดไปมาและ incubate บนน้ำแข็ง 5 นาที เติม ice cold potassium acetate pH 4.8 (เตรียมโดยเติม glacial acetic acid 3 ml และน้ำกลั่น 1 ml ลงใน 5 M potassium acetate 15 ml) ปริมาตร 150 µl ผสมด้วยการ vortex ระยะสั้นๆ incubate บนน้ำแข็งอีก 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g ที่ 4°C 5 นาที ไปเปตของเหลวส่วนใส (supernatants) ลงใน eppendorf tube ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g ที่ 4°C 5 นาทีอีกครั้งและไปเปต supernatants) ลงใน eppendorf tube ใหม่ ในขั้นนี้จะได้ supernatants ประมาณ 400 µl เติม RNaseA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/ml และ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30นาที เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ประมาณ 400 µl ผสมด้วยการ vortex ปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 2 นาที ไปเปตส่วนที่เป็นของเหลวลงใน eppendorf tube ใหม่ เติม ice cold absolute ethanol 1 ml (หรือ 2.5 volume) ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา และ incubate ที่อุณหภูมิ -70°C นาน 30 นาที หรือ incubate ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 คืน ปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ไปเปตส่วนใสทิ้ง ล้าง DNA pellets ด้วย ice cold 70% ethanol ปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 1 นาที ไปเปตส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ DNA pellets แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที ละลาย DNA pellets ในน้ำกลั่นหรือ TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) ปริมาตร 15 µl

เฉพาะเชื้อที่มี plasmid และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จะนำมาทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยวิธี filter mating หรือ conjugation โดยเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ที่มี plasmid และดื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นตัวให้ (donors) ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ที่ไม่มี plasmid และไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ เป็นตัวรับ (recipients)

สำหรับการเตรียม recipients เชื้อ *Lactobacillus* คือ *L. plantarum* L11.1(2) และ *L. plantarum* L 11.5(2) ส่วน *Bacillus* คือ *B. subtilis* B1.6 และ *B. licheniformis* B10.2 เชื้อทั้ง 4 isolates ไวต่อยาทุกชนิดที่ทดสอบ ดังนั้นเพื่อให้สามารถแยกได้จาก donors จึงทำให้เชื้อทั้ง 4 ดื้อยา rifampicin แบบ spontaneous mutationsย โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หรือ LB 4 มล. ใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. วัดค่า OD_{600} และ Plate 100 µl บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS หรือ LB ที่มี rifampicin ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128 µg/ml อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 18-24 ชม.ชุดควบคุมคือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี rifampicin จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin 64 และ 128 µg/ml นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี rifampicin และนำโคโลนีที่ได้ในแต่ละวันมา streak อย่างต่อเนื่องทุกวันนาน 10 วัน เมื่อครบกำหนดทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

rifampicin ที่ความเข้มข้นที่เกี่ยวข้องอีกครั้ง จากนั้นหาค่า MIC ต่อยา rifampicin ชุดควบคุมคือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี rifampicin เก็บโคโลนีที่มีค่า MIC ต่อ rifampicin สูงและค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆ ไม่แตกต่างจาก parents ให้ชื่อว่า Lactobacillus mutants ว่า L11.1(2)rif' และ L11.5(2)rif' ส่วนให้ชื่อว่า Bacillus mutants B1.6 rif' และ B1.2rif'

สำหรับ *Lactobacillus* เพาะเลี้ยง donors และ recipient ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดเหลว 4 มล. ใน shaking incubator ที่ 37 °C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเจือจางด้วย MRS ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อใน shaking incubator ที่ 37 °C จนถึง Mid-log phase (3-4 ชม.) ผสมตัวรับและตัวให้อย่างละ 1 ml ใน eppendrof tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนใน MRS broth อุ่นที่อุณหภูมิ 37°C 30-50 µl และไปเปตลงบนแผ่น nitrocellulose filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ pore size 0.45 µm ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 18-24 ชม.จากนั้นนำแผ่น filter พร้อมส่วนผสมเชื้อใส่ลงใน MRS broth 1 มล. ใน eppendrof tube ใหม่ vortex ประมาณ 1 นาที นำแผ่น filter ออก และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 1 นาที Plate เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี rifampicin 50 µg/ml และยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม คัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อ rifampicin และยาปฏิชีวนะที่เกี่ยวข้อง ทำการสกัด plasmid จาก transconjugants และตรวจสอบว่ามี plasmid หรือไม่บน gel electrophoresis ชุดควบคุมคือ *lactobacillus* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin หรือ rifampin และยาฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก transconjugants คือ rifampin 50 µg/ml, tetracycline 10 µg/ml, erythromycin 20 µg/ml และ vancomycin 32 µg/ml

สำหรับ *Bacillus* ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยวิธีเดียวกัน โดยใช้อาหารเลี้ยง Luria Bertani (LB) broth

ระยะที่ 7 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา

ในการตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาเน้นที่ยีนควบคุมดื้อต่อยา tetracycline, vancomycin, erythromycin และ streptomycin โดยครอบคลุมเชื้อที่ดื้อยาและมี plasmid ด้วย โดยใช้เทคนิค PCR และ primers ที่จำเพาะดังแสดงในตารางที่ 2

โดยตรวจหาการปรากฏของยีน *aadE*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* และ *tetW* ในเชื้อ Lactobacillus และ Bacillus อย่างละ 20 isolates ยีน ในเชื้อ *vanA*, *vanB* และ *vanC* ใน *Lactobacillus* และ *Bacillus* จำนวน 19 และ 25 isolates ตามลำดับ ส่วนยีน *ermA*, *ermB* และ *ermC* ทำเฉพาะใน Bacillus จำนวน 12 isolates เพราะตรวจไม่พบ *Lactobacillus* ที่ดื้อต่อยา erythromycin รายละเอียดชนิดของเชื้อที่ได้รับการปรากฏของยีนดื้อยาแสดงในภาคผนวก

สำหรับ E. faecium จำนวน 6 isolates ที่แยกได้และมาสามารถเจริญเติบโตดี ได้นำโคโลนีที่มีอยู่มาเตรียม whole cell DNA ด้วยวิธี Boiling preparation (27) โดยนำโคโลนีมาละลายในน้ำกลั่น 50 µl และต้มน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นปั่นแยกเอาตะกอนออก เก็บ DNA ในของเหลวใสที่ -20°C

ผลการวิจัย

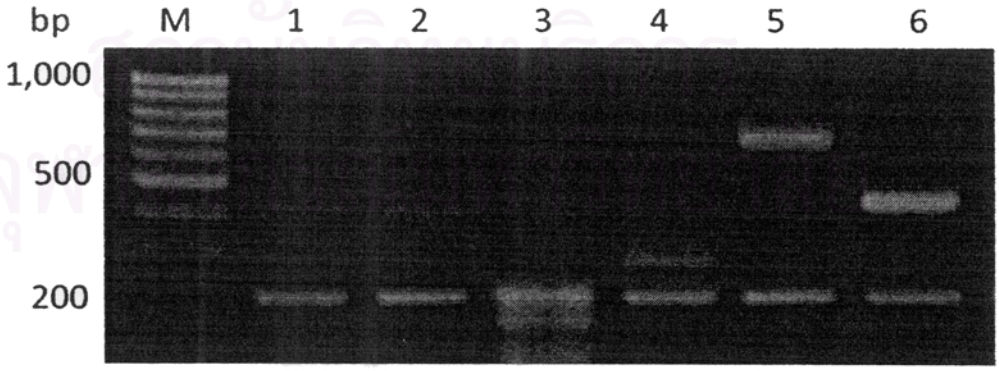
การแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อ Probiotic bacteria

ในการวิจัยครั้งนี้ เก็บเชื้อ *Lactobacillus* ได้ทั้งหมด 124 isolates โดยเชื้อที่ทำการยืนยัน species ด้วยวิธี multiplex ทั้งหมด 82 isolates ซึ่งครอบคลุมเชื้อจากตัวอย่างทุกชนิดที่ทดสอบ (ตารางที่ 4) ในการพิสูจน์ยืนยันด้วย multiplex PCR ได้ PCR products ดังรูปที่ 1

ตารางที่ 4 species ของ *Lactobacillus* ที่แยกได้ (n = 82)

	เชื้อ	จำนวน (%)
1	*L. plantarum*	39 (47.6)
2	*L. rhamnosus*	21 (25.6)
3	*L. gasseri*	5 (6.1)
4	*L. delbrueckii*	11 (13.4)
5	*L. casei* group	6 (7.3)

รูปที่ 1 PCR products ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* ด้วยเทคนิค multiplex PCR



เชื้อที่เป็น *Lactobacillus* spp. ให้ PCR products ขนาด ~200 bp โดย M, Molecular weight marker; lane 1, *L. plantarum* 428 bp; lane 2, *L. plantarum* 428 bp; lane 3, *L. delbrueckii* 184 bp; lane 4, *L.gasseri* 272 bp; lane 5, *L.casei*-group 727 bp; lane 6, *L.rhamnosus* 448 bp

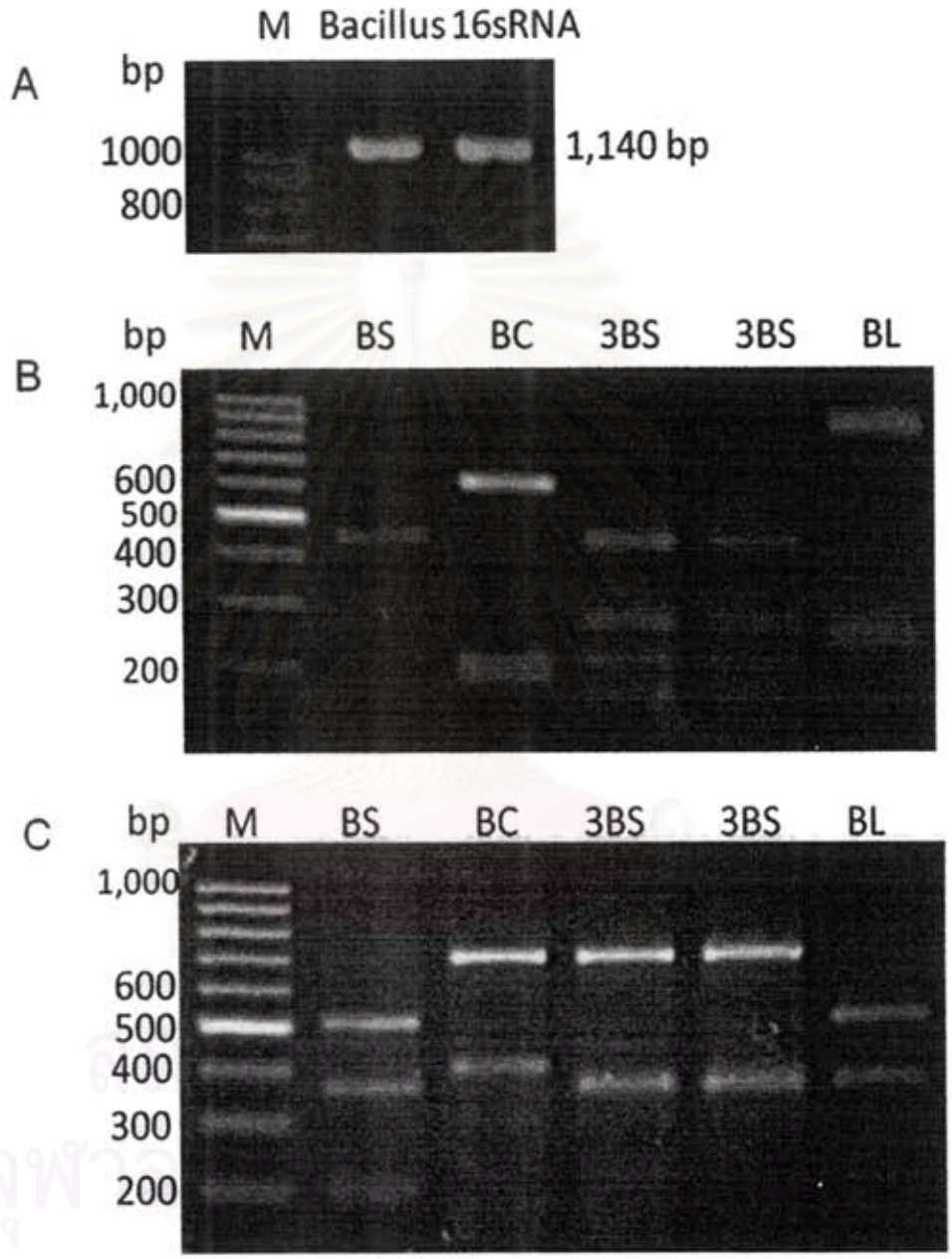
ในขั้นต้นเก็บเชื้อ *Bacillus* ทั้งหมด 164 isolates โดยเชื้อที่ทำการยืนยัน species ด้วยวิธี ARDRA ทั้งหมด 119 isolates (ตารางที่ 5) โดยการพิสูจน์ยืนยันด้วย ARDR ได้ ARDRA patterns ดังรูปที่ 2 ซึ่งเชื้อ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B.cereus* และ Three members of the *B. subtilis* cluster ให้ ARDRA patterns ตามรูปแบบที่ถูกต้อง (46)

ตารางที่ 5 species ของ *Bacillus* ที่แยกได้ (n = 119)

	เชื้อ	จำนวน (%)
1	*B. subtilis*	31 (26.1)
2	*B. licheniformis*	6 (5.0)
3	Three members of the *B. subtilis* cluster (*B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. atrophaeus*)	73 (61.3)
4	*B. cereus*	9 (7.6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

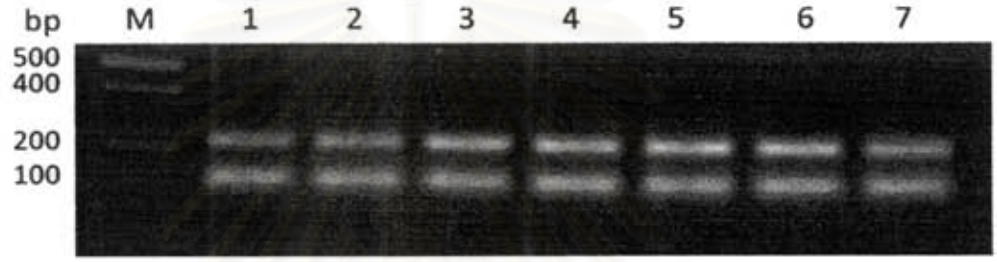
รูปที่ 2 รูปแบบ ARDRA ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Bacillus*



16sRNA จาก *Bacillus* spp ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 1,140 bp (A) ซึ่งนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* (B) และ *TaqI* (C) โดย M, Molecular weight marker; BS, *B. subtilis*; BL, *B.licheniformis*; BC, *B. celeus* และ 3BS, B. subtilis cluster

ในการวิจัยครั้งนี้ เก็บเชื้อ *Enterococcus* ได้ทั้งหมด 7 isolates แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 4, 5 และ 6 จำนวน 3, 3 และ 1 isolates ตามลำดับ โดยเชื้อทั้งหมดที่ทำการยืนยัน species ด้วยวิธี multiplex และเนื่องจากมีเชื้อเพียงจำนวน 7 isolates จึงยืนยันทุกตัวด้วย sequencing พบว่าเป็น *E. faecium* ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 3 PCR products ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* จำนวน 7 isolates ด้วยเทคนิค multiplex PCR



เชื้อที่เป็น *Enterococcus* spp. ให้ PCR products ขนาด ~112 bp *E. faecium* ให้ PCR product ขนาด 215 bp โดยทำการยืนยันอีกครั้งด้วย sequencing โดย M, Molecular weight marker; lane 1-7, *E. faecium*

จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในสารเสริมชีวนะ

ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตในสารเสริมชีวนะที่ทดสอบแสดงในตารางที่ 6 ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มีจำนวนแบคทีเรียตามที่ระบุบนฉลาก ยกเว้นผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 3, 9, 10 และ 11 โดยไม่พบแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตในสารเสริมชีวนะชนิดที่ 13 ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ 10 และ12 ระบุว่ามี *Enterococcus* แต่ตรวจไม่พบในห้องปฏิบัติการ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ที่ 5, 8, 9, 10 และ 11 ที่ระบุว่ามี *L. acidophilus* บนฉลาก แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิดนี้ อย่างไรก็ตามจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจนับเป็นจำนวนของ Genus โดยไม่ได้แบ่งตาม species

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะ (n = 13)

Product no.	Analysis of probiotic products		
	Strain	Number	Specific species
1	*Bacillus* spp.	$1x10^9$	*B. subtilis, B. licheniformis,*members of the
	Lactobacillus spp.	$6x10^8$	*B.subtilis* cluster[b], *L. plantarum, L. gasseri*
2	*Bacillus* spp.	$1x10^6$	*B. subtilis, B. licheniformis,* members of the
	Lactobacillus spp.	80	*B.subtilis* cluster, *L. plantarum, L. delbrueckii*
3	*Bacillus* spp.	$9.4x10^6$	members of the *B.subtilis* cluster
4	*Bacillus* spp.	$3.8x10^7$	*B. subtilis, B. cereus, B. licheniformis,*
	Lactobacillus spp.	$1.9x10^7$	*L. delbrueckii, E. faecium*
	Enterococcus spp.	$1.1x10^7$	
5	*Bacillus* spp.	$1.7x10^7$	*B. subtilis,* members of the *B.subtilis* cluster, *L.*
	Lactobacillus spp.	$2.5x10^7$	*rhamnosus, L. plantarum, L. gasseri, E. faecium*
	Enterococcus spp.	$1.8x10^7$	
6	*Bacillus* spp.	$3.8x10^6$	*B. subtilis,* members of the *B.subtilis* cluster,
	Lactobacillus spp.	$1.2x10^7$	*L. rhamnosus, L. plantarum, L. delbrueckii,*
	Enterococcus spp.	$4.0x10^6$	*E. faecium*
7	*Bacillus* spp.	$5.5x10^7$	*B. licheniformis,* members of the *B.subtilis*
	Lactobacillus spp.	$1.4x10^7$	cluster, *L. rhamnosus, L. plantarum, L. delbrueckii, L casei* gr.
8	*Bacillus* spp.	$3.1x10^6$	*B. subtilis,* members of the *B.subtilis* cluster,
	Lactobacillus spp.	$4.8x10^6$	*L. rhamnosus, L. plantarum, L. delbrueckii, L casei* gr.
9	*Bacillus* spp.	$3.2x10^6$	members of the *B.subtilis* cluster
	Lactobacillus spp.	$8.0x10^6$	*L. rhamnosus, L. gasseri*
10	*Bacillus* spp.	$3.0x10^5$	members of the *B.subtilis* cluster
	Lactobacillus spp.	$2.5x10^3$	*L. plantarum*
11	*Bacillus* spp.	$1.4x10^8$	*B. subtilis,* members of the *B.subtilis* cluster, *L.*
	Lactobacillus spp.	$4.2x10^8$	*plantarum*
12	*Bacillus* spp.	$1.3x10^8$	*B. subtilis,* members of the *B.subtilis* cluster
13	NF[c]	NF	NF

[a] CFU/g สำหรับทุกผลิตภัณฑ์ยกเว้นผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1 (CFU/ml)

[b] *B. pumilus, B. amyloliquefaciens* and *B. atrophaeus*

[c] NF not found

การปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli*

ในการวิจัยครั้งนี้ ไม่พบการปนเปื้อน *Salmonella* และ *E. coli* ในตัวอย่างใดๆ เลย

ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Enterococcus* ได้ เพราะเชื้อที่เก็บไว้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อทำการแยกและเก็บเชื้อซ้ำให้ผลเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* เท่านั้น โดยค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* แสดงในตารางที่ 7 และ 8 อัตราการดื้อต่อปฏิชีวนะของ เชื้อทั้ง 2 ชนิดแสดงในตารางที่ 9 เชื้อ *Lactobacillus* ทุกตัวดื้อยา gentamycin โดยเชื้อชนิดนี้ดื้อยา ampicillin, kanamycin และ streptomycin ในอัตราสูงมาก (91.5, 91.5 และ 92.7 % ตามลำดับ) โดยไม่ดื้อต่อยา chloramphenicol, erythromycin และ rifampicin ส่วน *Bacillus* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบในอัตราที่ต่ำกว่า *Lactobacillus* มากโดยดื้อต่อยา tetracycline ในอัตราสูงสุด (12.2 %)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus*

เชื้อ (n)	AMP	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
L. plantarum (39)	2 - >8	2 - 8	0.5 - >16	0.25 - >1	1 - >4	0.5 - 128	1 - 128	0.25 - 32	1 - 64	0.25 - 32	1 - >64	0.25 - >32
L. rhamnosus (21)	1 - 4	4 - 8	0.5 - >16	0.25 – 0.5	1 - >4	0.5 - >128	4 - 64	0.25 - 16	16 - 64	0.5 - 8	16 - >64	0.25 - >32
L gasseri (5)	2 - >8	4 - 8	0.5 - >16	0.25 – 0.5	1 - >4	64 - >128	4 - 128	1 - 16	8 - 16	0.5 - 8	8 - >64	1 - >32
L. delbrueckii (11)	2 - >8	2 - 8	0.5 - >16	0.25 – 0.5	1 - >4	128 - >128	4 - 128	1 - 16	16 - 64	0.5 - 8	16 - >64	1 - >32
L. casei group (6)	2 - 4	4 - 8	1 - >16	0.25	1 - >4	0.5 - >128	1 - 128	0.25 - 16	16 - 64	4 - 8	8 - >64	0.25 - >32

ตารางที่ 8 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะของ *Bacillus*

เชื้อ (n)	AMP	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
B. subtilis (31)	0.25 - 1	1 - 16	0.125	0.25 – 0.5	0.25 – 0.5	0.5 - 1	0.25 - 1	0.25 – 0.5	0.5 - 64	0.25 - >64	0.25 - >64	0.25 - >32
B. licheniformis (6)	0.25 - 1	4 - 16	0.125	0.25 - >32	0.25 – 2	0.5 - 2	0.25 - 8	0.25 – 0.5	1 - 16	0.25 - 32	0.25 – 0.5	0.25 - 16
B. subtilis cluster (73)	0.25 - >8	1 - 8	0.125 - 0.5	0.25 - >32	0.25 – 4	0.5 - 2	0.25 - 128	0.25 – 32	0.5 - 32	0.5 - >32	0.25 - 8	0.25 - >32
B. cereus cluster (9)	0.25 - >8	4 - 8	0.125 - 0.25	0.25	0.25 – 0.5	0.5 - 2	0.25 - 1	0.25 - 1	2 - 64	0.5 - 16	0.25 - >64	0.25 -2

ตารางที่ 9 อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (%) ของ *Lactobacillus (n* = 82 *)* และ *Bacillus (n* = 119*)*

เชื้อ	AMP	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
Lactobacillus spp.	91.5	0	51.2	0	100	91.5	52.4	0	92.7	11	70.7	42.7
Bacillus spp.	6.1	2.4	0	7.3	0	0.6	0.6	6.1	2.4	12.2	4.3	8.5

ความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

เชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 20 isolates มี plasmid ซึ่งอยู่ใน species ต่างๆ และมีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะดังแสดงในตารางที่ ส่วน *Bacillus* จำนวน 3 colonies ที่มี plasmid ขนาด 9,000 bp โดยเชื้อทั้ง 3 ดื้อต่อยา vancomycin, erythromycin และ/หรือ rifampicin โดยมีค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ดังแสดงในตารางที่ 11

ในการวิจัยครั้งนี้ spontaneous rifampicin resistant mutants ของ *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นตัวรับคือ L11.1(2)rif^r (MIC = 64µg/ml) และ L11.5(2)rif^r (MIC = 64µg/ml) ส่วน spontaneous rifampicin resistant mutants ของ *Bacillus* คือ B1.6 rif^r (MIC =64 µg/ml) และ B1.2rif^r ดื้อต่อยา (MIC =64 µg/ml) ผลการวิจัยไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาในเชื้อที่ใช้ทดสอบทั้ง inter และ intra-species

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* ที่มี plasmid (n = 18)

No	ID	Strain	Resistance pattern	MIC (µg/ml)									
				AMP	CIP	GEN	KAM	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
1	L1.4	*L. gaseri*	AMP-CIP-GEN-KAN-NEO-STR-VAN	>8	>16	4	64	128	1	16	8	8	>32
2	L2.1	*L. delbrueckii*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI-VAN	>8	>16	1	>128	4	1	16	8	32	>32
3	L2.5	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-NEO-STR-TET-TRI-VAN	4	>16	1	128	64	1	16	16	32	>32
4	L9.3	*L. delbrueckii*	AMP-GEN- KAN-NEO-STR	8	0.5	4	>128	32	16	32	0.5	16	1
5	L9.8	*L. rhamnosus*	GEN- KAN-NEO-STR-TRI	1	0.5	4	>128	64	16	32	0.5	32	1
6	L9.12	*L.plantarum*	GEN- KAN-NEO-STR-TRI	1	0.5	4	>128	64	16	64	0.5	32	1
7	L10.1	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-STR-VAN	2	4	2	0.5	4	0.25	16	8	16	4
8	L10.4	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-VAN	4	16	1	64	8	0.25	16	8	4	>32
9	L10.10	*L. casei* group	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-VAN	2	4	2	64	16	0.25	64	4	16	>32
10	L10.14	*L. casei* group	AMP-CIP-GEN-KAN-STR	2	4	2	32	8	0.25	64	4	8	0.25
11	L10.1	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI-VAN	2	4	4	64	16	0.25	64	8	64	16
12	L10.2	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI-	2	4	4	32	16	0.25	64	8	64	>32
13	L10.5	*L. rhamnosus*	AMP-GEN-KAN-NEO-STR-	2	1	>4	>128	128	16	64	8	16	2
14	L13.2	*L.plantarum*	AMP-GEN-KAN-STR-TRI	2	0.5	>4	>128	16	16	64	1	32	1
15	L13.5	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI	4	0.5	>4	>128	16	16	64	1	64	1
16	L14.8	*L.plantarum*	AMP-GEN-KAN-NEO-STR-TET-TRI-	2	8	>4	>128	64	8	64	32	64	0.25
17	L14.9	*L.plantarum*	AMP-GEN-KAN-STR-TET-TRI-VAN	2	0.5	>4	64	16	8	64	32	>64	32
18	L14.10	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-NEO-RIF-STR-TET-TRI-VAN	2	8	>4	>128	64	32	64	32	>64	32

ตารางที่ 11 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Bacillus* ที่มี plasmid (n = 3)

No	ID	Strain	Reistance patterns	MIC (µg/ml)									
				AMP	CIP	GEN	KAM	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
1	B10.8	*B. cereus*	ERY- VAN	1	0.125	2	2	8	8	16	0.25	1	16
2	B10.9	*B. cereus*	RIF-VAN	1	0.125	1	2	8	16	4	0.25	1	16
3	B10.10	*B. licheniformis*	RIF-VAN	1	0.125	2	2	8	8	1	16	0.25	15

การปรากฏของยีนดื้อยา

ในการวิจัยครั้งนี้ คัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* แบบสุ่มเพื่อตรวจหาการปรากฏของยีนควบคุมการดื้อต่อยา tetracycline, vancomycin และ streptomycin โดยครอบคลุมเชื้อที่ดื้อยาแต่ละชนิดและมี plasmid ด้วย ในการวิจัยครั้งนี้ พบยีน *vanA* ในเชื้อ L10.3 (1) ซึ่งเชื้อตัวนี้ไม่มี plasmid

เนื่องจากเชื้อ *Bacillus* ที่ดื้อยาและมี plasmid มีจำนวนไม่มาก ดังนั้นในการวิจัยจึงทำการตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาในเชื้อที่ดื้อต่อ tetracycline, vancomycin, erythromycin และ aminoglycosides ที่ไม่มี plasmid ด้วย โดยพบการปรากฏของยีน *tetW* และ *vanA* ใน B8.7.1 ซึ่งเชื้อตัวนี้ไม่มี plasmid เช่นกัน

ส่วน *E. faecium* ทั้งหมดได้ถูกนำมาตรวจหาการปรากฏของยีนทั้งหมดจาก whole cell DNA เช่นกัน พบว่าเชื้อจำนวน 2 isolates (E1 และ E2) มียีน *vanA* เนื่องจากเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีก จึงไม่ทราบว่ามี plasmid หรือดื้อยา vancomycin ไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายผลการวิจัย

จากที่การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นและไม่สุขุมรอบคอบในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคเป็นต้นเหตุสำคัญของการเกิดเชื้อดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยา โดยเชื้อดื้อยาดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้โดยผ่านห่วงโซ่อาหารและอาจถ่ายทอดตัวระบุการดื้อยาไปยังแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ในปัจจุบันได้มีการเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและมีการส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์ ส่งผลให้มีการพัฒนาการผลิตสารทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ซึ่งในปัจจุบัน ยังไม่มีสารทดแทนยาปฏิชีวนะชนิดใดที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าการใช้ยาปฏิชีวนะ รวมทั้งสารเหล่านี้มีราคาแพงและมักเป็นสินค้านำเข้า ส่งผลให้สารเสริมชีวนะได้รับความนิยมและมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น โดยทั่วไป สารเสริมชีวนะประกอบด้วยแบคทีเรีย ยีสต์และรา ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตจะต้องได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยหรือ GRAS ซึ่งมักเป็นแบคทีเรียกลุ่ม lactic acid producing bacteria ที่รวมถึง *Lactobacillus* , *Enterococcus* และ *Bacillus* เช่นเดียวกับสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ นอกจากนี้ แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา โดยถ้าสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ประกอบด้วยเชื้อดื้อยาจะส่งผลให้เกิดความเสียหายได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เพราะการใช้สารเสริชีวนะในการเลี้ยงสัตว์จะใช้คราวละมากๆ และใช้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้เห็นผลด้านการเร่งการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังมีคำถามสำคัญเกี่ยวกับคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังคงมีอยู่ ซึ่งรวมถึงสารเสริมชีวนะมีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคหรือเชื้อดื้อยาอื่นๆ หรือไม่ สารเสริมชีวนะมีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์จริงหรือไม่ รายละเอียดที่ระบุบนฉลากถูกต้องหรือไม่

สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีหลายชนิด อาจมีมากถึง 30 ชนิด (ติดต่อส่วนตัว) แต่เนื่องจากยังไม่มีการจัดระเบียบสารเสริมชีวนะอย่างจริงจังและเป็นระบบ ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าชนิดของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายทั้งหมดมีอะไรบ้าง รวมถึงไม่ทราบข้อมูลผู้ผลิตหรือผู้แทนจำหน่ายทั้งหมด ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์จำนวน 13 ชนิด ซึ่งส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ผลิตหรือผู้แทนจำหน่ายที่เห็นความสำคัญของการศึกษาวิจัยด้านคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ อีกส่วนหนึ่งคณะผู้วิจัยได้จัดซื้อเองจาก อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์บางชนิดต้องสั่งซื้อโดยตรงจากผู้ผลิตหรือผู้แทนจำหน่ายเท่านั้น ซึ่งผู้แทนจำหน่ายบางกลุ่มไม่ให้ความร่วมมือ เนื่องจากไม่เห็นความสำคัญของการวิจัยหรือเกรงว่าผลการวิจัยจะกระทบต่อการขายถ้ามีการตีพิมพ์ผลงาน ในขั้ตอนการเก็บตัวอย่างนี้เห็นได้ว่า ควรส่งเสริมความรู้ความเข้าใจให้กับผู้ผลิตหรือผู้แทนจำหน่ายให้เห็นความสำคัญของการศึกษาวิจัยด้านคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การระบุสายพันธุ์และการดื้อยาของเชื้อตั้งต้น

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเป็นสารเสริมชีวนะมีหลายชนิด แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน รวมทั้งบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจก่อโรคหรือสร้างสารพิษได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียสารเสริมชีวนะชีวนะอย่างถูกต้อง ผลการวิจัยพบว่า ชนิดของแบคทีเรียที่ระบุบนฉลากของผลิตภัณฑ์ทุกชนิดไม่ตรงกับที่ตรวจพบ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งผู้ผลิต

ระบุว่าประกอบด้วยเชื้อ *B. subtilis* เท่านั้น แต่กลับตรวจพบว่ามี *Lactobacillus* หลาย species รวมทั้งยังมี *Bacillus* spp อื่นๆ อีกด้วย การพบแบคทีเรีย Genus ที่ไม่ได้ระบุบนฉลากแสดงถึงความบกพร่องของการเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นและกระบวนการผลิต ส่วนการที่ spcecies ของแบคทีเรียแตกต่างจากที่ระบุไว้นั้นอาจเนื่องมาจากความไม่จำเพาะหรือความจำกัดในประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ในการระบุ species ผู้ผลิตได้ทำการผลิตสารเสริมชีวนะเหล่านี้เป็นเวลานาน โดยใช้แบคทีเรียตั้งต้นที่จำแนกชนิดด้วยวิธีที่ไม่ทันสมัยและใช้ในการผลิตต่อมาจนปัจจุบัน ดังนั้นผู้ผลิตควรใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการระบุ specis ของเชื้อเหล่านี้ ตามพระราชบัญญัติอาหารสัตว์ พ.ศ. 2536 ได้อนุญาตให้ใช้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 42 ชนิดเป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ซึ่งเชื้อที่พบในการวิจัยครั้งนี้บางชนิดไม่ได้อยู่ในรายชื่อเหล่านี้ การพบเชื้อ lactic acid bacteria ต่างชนิดอาจไม่มีผลอันตรายต่อคนหรือสัตว์ เพราะเชื้อเหล่านี้เป็น GRAS อยู่แล้ว แต่ถือเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับในสิ่งที่ระบุหรือบ่งบอกรายละเอียดที่ถูกต้องชัดเจน ซึ่งรวมถึงสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียเหล่านี้ไม่ได้ก่อประโยชน์ใดๆ ตามที่ผู้ผลิตกล่าวอ้าง

Bacillus หลายชนิดได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ได้แก่ *B. subtilis, B. pumilus, B. cereus* (ยกเว้น *B. anthracis*), *B. coagulans, B. clausii, B. licheniformis, B. megaterium* เป็นต้น เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษและก่อโรคได้ จึงต้องระมัดระวังในการระบุชนิดและสายพันธุ์ ในการวิจัยครั้งนี้ แบคทีเรียชนิดที่พบว่ามีความผิดพลาดในการระบุ species มากที่สุด คือ *B. subtilis* เชื้อในกลุ่มนี้ (the *B. subtilis* group) ประกอบด้วย 4 spcies คือ *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis* และ *B. pumilus* ในขณะที่เชื้อที่มีความใกล้ชิดกับ *B. subtilis* อย่างมากคือ *B. atrophaeus, B. mojavensis* และ *B. vallismortis* ซึ่งต้องใช้ลำดับเบสของ 16s rRNA ในการจำแนกเชื้อเหล่านี้ เชื้อ *Bacillus* เหล่านี้สามารถก่อโรคได้ เช่น *B. pumilus* ที่ทำให้เกิดโรคที่มีอาการคล้าย listeriosis, *B. licheniformis* ทำให้เกิดอาการ toxemia และแท้งได้ อย่างไรก็ตามพบอัตราการเกิดโรคจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้น้อยมากและมักพบในสัตว์ที่มีปัญหาความบกพร่องของระบบการสร้างภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจึงควรที่จะระบุชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในชัดเจน การที่ผู้ผลิตระบุว่าเป็น *B. subtilis* ทั้งหมดแสดงถึง การใช้เทคนิคในการจำแนกเชื้อที่มีศักยภาพไม่เพียงพอและอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ในระยะยาว โดยเฉพาะในกรณีที่สัตว์ทั้งฝูงอยู่ในสภาวะเครียดและเกิดการติดเชื้อจะส่งผลให้การวินิจฉัยคลาดเคลื่อน

สำหรับวิธี multiplex PCR ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ไม่สามารถจำแนก *B. cereus, B. anthracis* และ *B. thuringensis* ได้ (46) แต่เมื่อประกอบกับผลทางชีวเคมีและการถอดรหัสพันธุกรรมสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ไม่ได้ระบุเชื้อชนิดนี้ไว้บนฉลาก เชื้อ *B. anthracis* เป็นสาเหตุของโรค Anthrax ส่วน *B. thuringensis* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อแมลง (insect toxic protein) ซึ่งใช้ในการผลิตยาป้องกันพืชได้ ซึ่งเคยมีรายงานการแยกเชื้อนี้ได้จากอุจจาระของคนงานที่ทำงานใน green house ซึ่ง *B. cereus* และ *B. thuringensis* สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษในคนได้ ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยสามารถบอกได้ว่า เป็นเชื้อ *B. cereus* แต่ยังไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (46)

เชื้อ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบไม่ตรงกับที่ระบุบนฉลาก มักมี species มากเกินกว่าที่ระบุ นอกจากนี้ไม่พบ *L. acidophilus* ในผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่ามีเชื้อชนิดนี้เลย แต่พบว่ามี *Lactobacillus* ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความยากของการจำแนกชนิดแบคทีเรีย genus นี้ โดยเชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คล้ายกันมาก ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีทางอะณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดเชื้อ

ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 13 เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวที่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียที่มีชีวิตเลย ซึ่งในขณะที่ทำการตรวจยังไม่ถึงวันหมดอายุ ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ได้นำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยแนะนำใช้ในการเลี้ยงไก่ สาเหตุของการที่ไม่พบเชื้อชนิดใดเลยอาจมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ดี เพราะต้องผ่านขั้นตอนการขนส่งหลายขั้นตอนและเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม ถือว่าไม่มีคุณภาพและไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ใดๆ กับสัตว์ทั้งสิ้น

เนื่องจากประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะขึ้นกับจำนวนของแบคทีเรียที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ ในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดจำนวนที่แน่นอนของเชื้อที่ต้องให้กับสัตว์เพื่อให้เกิดผลในการเร่งการเจริญเติบโต ในคนแนะนำให้บริโภคอย่างน้อยวันละ 10^6 – 10^9 cells โดยทั่วไปสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์มีเชื้อประมาณ 10^9-10^{10} CFU/g โดยพระราชบัญญัติอาหารสัตว์ พ.ศ .2536 กำหนดให้สารเสริมชีวนะที่เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้มีเชื้อในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU/kg ซึ่งผลิตภัณฑ์ 12 ชนิดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีจำนวนแบคทีเรียเกินกว่าจำนวนที่กำหนดตามพระราชบัญญัติ อย่างไรก็ตาม บางชนิดมีน้อยกว่าที่กล่าวอ้างบนฉลาก

การดื้อยาของเชื้อที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์เป็นประเด็นสำคัญด้านความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์เหล่านี้ เชื้อเหล่านี้บางชนิดดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติอยู่แล้ว เช่น *Lactobacillus* มักดื้อต่อยา ampicillin, vancomycin และ ciprofloxacin ส่วน *Bacillus* มักดื้อต่อยา ampicillin เป็นต้น นอกจากนี้การดื้อยา aminoglycosides ใน Lactic acid bacteria โดยส่วนใหญ่เกิดจากปัจจัยภายใน (intrinsic resistance) ของเชื้อและความผิดปกติที่เกิดจากการขาดหายของ cytochrome-mediated electron transport ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดี (bile) จำทำให้เชื้อไวต่อยาในกลุ่มนี้มากขึ้นด้วย ในการวิจัยครั้งนี้เชื้อ *Lactobacillus* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในอัตราสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในเชื้อที่ใช้เป็น starter แต่ในทางตรงกันข้าม พบว่าอัตราการดื้อยาในเชื้อ *Bacillus* ต่ำกว่ามาก การดื้อยาในเชื้อ *Lactobacillus* ไม่ขึ้นกับ species โดยทั่วไปแล้วการหาค่า MICs ค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างจำเพาะและเชื้อแต่ละ species มีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ เลือกใช้วิธีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการยืนยันว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ สามารถใช้ได้กับ *Lactobacillus* หลาย species ดังนั้นผลการวิจัยที่ได้เกี่ยวกับการหาค่า MICs ของเชื้อ *Lactobacillus* จึงเชื่อถือได้

โดยทั่วไป Lactic acid bacteria มี plasmid ขนาดต่างๆ กัน ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่มี plasmid (3 isolates) มีจำนวนน้อยกว่าเชื้อ *Lactobacillus* (18 isolates) ในการวิจัยครั้งนี้ไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยา ซึ่งเชื้อที่ใช้เป็นตัวรับเป็นเชื้อที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ ดังนั้นผลการวิจัยวิจัยแสดงว่า เชื้อที่ใช้ทดสอบไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการถ่ายทอดยีนดื้อยาและยีนดื้อยาไม่ได้อยู่บน plasmid อย่างไรก็ตาม อาจมียีนดื้อยาอื่นๆที่ไม่ได้ถูกครอบคลุมถึงในการวิจัยครั้งนี้อยู่บน plasmid และอาจถ่ายทอดได้ ดังนั้นจึงน่าจะมี

การศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคในคน นอกจากนี้การตรวจพบยีน *tetW* และ *vanA* ใน B8.7.1 และยีน *vanA* ในเชื้อ L10.3 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ตัวนี้ไม่มี plasmid ดังนั้นจึงไม่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธี conjugation

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถทำการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาในเชื้อ *Enterococcus* ได้ ถึงแม้ว่าเชื้อชนิดนี้จะได้รับการยอมรับให้ใช้เป็น probiotic bacteria ได้ แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นการพบเชื้อชนิดนี้ใน Probiotics สำหรับสัตว์จึงเป็นจุดที่ควรระมัดระวังและควรมีการศึกษาต่อไป ข้อสังเกตุประการหนึ่ง คือ Probiotics ที่มี *Enterococcus* เป็นส่วนประกอบมักจะระบุบนฉลากว่า *Streptococcus faecium* ซึ่งเป็นอีกชื่อหนึ่งของแบคทีเรียชนิดนี้ การระบุเช่นนี้อาจจะเป็นการกระทำของผู้ผลิตโดยตั้งใจหรือไม่ก็ตาม แต่ถือเป็นการบิดเบือนและทำให้เข้าใจที่ไม่ถูกต้องได้

นอกจากนี้ การตรวจพบยีน *vanA* ใน *E. faecium* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจและระมัดระวัง ถึงแม้ว่าจะไม่ทราบว่าเชื้อเหล่านี้มี plasmid หรือดื้อยา vancomycin ไม่ก็ตาม เพราะ vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) เป็นเชื้อดื้อยาที่พบมากในผู้ป่วยและยีน *van A* มักอยู่บน plasmid (12) เชื้อเหล่านี้อาจถ่ายทอดยีน *vanA* ไปยังเชื้อที่ก่อโรคในคนหรือ enterococcus ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ได้ ดังนั้นการพบยีน *vanA*ใน *E. faecium* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในการวิจัยครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่า การใช้ probiotics เหล่านี้ในการเลี้ยงสัตว์อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องวางมาตรการเคร่งครัดและมีวิธีการตรวจที่ประสิทธิภาพสำหรับการนำเชื้อ *E. faecium* มาใช้ในผลิตสารเสริมชีวนะ รวมถึงอาจมีการทบทวนการอนุญาตให้ใช้เชื้อชนิดนี้ในการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ว่าเหมาะสมหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับผลเสียที่อาจเกิดขึ้น

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* และ *E. coli* โดยทั่วไป โอกาสที่จะพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* และ *E. coli* ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ชนิดแห้งค่อนข้างต่ำ เพราะสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์บางชนิดเป็นน้ำ บางชนิดผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้องทำให้ความชื้นหลงเหลืออยู่เกินกว่าที่ควรเป็นและอาจมีการปนเปื้อนในระหว่างผลิตเกิดขึ้นได้เพราะขั้นตอนการผลิตไม่ได้มาตรฐาน ถ้าหากพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* และ *E. coli* จะแสดงถึงความบกพร่องอย่างรุนแรงของการควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิต ประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่งของการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* และ *E. coli* คือ แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้บ่อยสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค โดยมักเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance, MDR) และสามารถถ่ายทอดตัวระบุการดื้อยาได้ โดยในปัจจุบันพบว่ามีตัวระบุการดื้อยาที่แพร่กระจายได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและลบ เช่น integrons ดังนั้น *Salmonella* และ *E. coli* ที่ดื้อยาอาจเป็นแหล่งของการแพร่กระจายยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะและยังสามารถถ่ายทอดต่อไปยังแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้ในที่สุด ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้ตรวจไม่พบแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดในผลิตภัณฑ์ชนิดใดๆ

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลด้านคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยพบว่าข้อบกพร่องของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ที่ตรวจพบมีดังนี้

1. การระบุ genus และ species ไม่ถูกต้อง
2. กล่าวอ้างชนิดของแบคทีเรียเกินกว่าที่มีอยู่จริง
3. มี genus และ species ที่ไม่ได้ระบุไว้บนฉลาก
4. มีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตต่ำกว่าที่กล่าวอ้างบนฉลาก โดยบางชนิดไม่มีเลย
5. ตรวจพบ *E. faecium* ที่มียีน *vanA* อาจเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินไปตามที่วางไว้และแผนบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยได้ทำการศึกษาระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะที่ดื้อยา ตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยสามารถสรุปผลการวิจัยตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยได้ดังนี้

1. โดยส่วนใหญ่ การระบุชนิดและสายพันธุ์ของ probiotic bacteria บนฉลากของผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ไม่ถูกต้อง แสดงถึงการระบุสายพันธ์ของแบคทีเรียตั้งต้นที่ไม่มีประสิทธิภาพ อาจเป็นผลมาจากความไม่ทันสมัยของเทคโนโลยี รวมถึงกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพ
2. การระบุจำนวนของ probiotic bacteria ผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์บางชนิดมากเกินกว่าที่มีอยู่จริงในผลิตภัณฑ์ บางชนิดไม่พบแบคทีเรียที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ อาจเกิดจากกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพตั้งแต่ต้น เกิดการสูญเสียแบคทีเรียที่มีชีวิตเนื่องจากการเก็บรักษาที่ไม่ดี รวมถึงความอ่อนแอและไม่สามารถทนมีชีวิตรอดอยู่ได้ของแบคทีเรียเหล่านี้เนื่องจากสภาพที่แห้งของสารเสริมชีวนะ
3. Probiotic bacteria ในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์บางชนิดเป็นเชื้อดื้อยาและมีการปรากฏของ plasmid ดังนั้น Probiotic bacteria เหล่านี้จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อและยีนดื้อยา โดยเฉพาะยีนดื้อยาอื่นๆ ที่ไม่ได้ครอบคลุมในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นที่จะต้องมีมาตรการควบคุมการผลิตและนำเข้าผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อย่างเข้มงวด มีการกำหนดแนวทางสำหรับการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ที่ชัดเจนและถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ รวมถึงควรส่งเสริมให้มีการศึกษาคุณสมบัติของ probiotic bacteria ทั้งด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

โดยสรุป การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีคุณภาพและปลอดภัย ดังนั้นเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดจึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตและที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ (fingerprinting) ของ probiotic bacteria ที่พบกับสายพันธุ์ของเชื้อมาตรฐาน ทั้งนี้เพราะเชื้อชนิด "species" เดียวกันแต่ละต่างสายพันธุ์ "strain" จะมีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันและสามารถก่อโรคหรือสร้างสารพิษที่ต่างกัน เชื้อที่ใช้เป็น probiotic bacteria ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เท่านั้น
2. ศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่จำหน่ายเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะมีการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ อย่างกว้างขวางและใช้ในปริมาณมากเช่นกัน
3. ศึกษาคุณภาพของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในเชิงจำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ตั้งแต่เมื่อถูกผลิตออกมา ระหว่างการเก็บรักษาและเมื่อใช้ในฟาร์ม เพื่อให้ทราบข้อมูลที่เกิดขึ้นจริงของสารเสริมชีวนะเหล่านี้ว่าสามารถคงคุณภาพตามที่ระบุไว้หรือไม่และได้นานเท่าไร รวมถึงยังมีคุณภาพดีหรือไม่เมื่อถึงจุดที่มีการนำไปใช้เลี้ยงสัตว์จริง
4. เป็นที่สังเกตว่า มีการตรวจพบว่า Lacobacillus และ Bacillus มี plasmid ถึงแม้จะไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัดในการวิจัย เช่น เทคนิคที่เลือกใช้ ความสามารถในการรับ plasmid ของตัวรับ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคตโดยใช้ตัวรับที่หลากหลายและเทคนิคอื่นๆ หรือปรับสภาวะเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ในการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงชนิดและพันธุกรรมการดื้อยาของ probiotic bacteria ที่เป็นส่วนประกอบของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในประเทศไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเช่นนี้มาก่อน จึงเป็นจุดเริ่มต้นของงานด้านการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. ข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นถึงคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายเพื่อการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน
5. ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตสารเสริมชีวนะที่มีคุณภาพและปลอดภัยขึ้นใช้เองในประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและการระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่จะนำมาใช้ในการผลิต
6. เป็นแนวทางสำหรับหน่วยงานที่รับผิดชอบในการวางมาตรการในการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่ชัดเจนและถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ เพื่อให้เป็นแนวทางเดียวกันในทางปฏิบัติและสามารถดำเนินการตรวจคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์และควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ในการผลิตสารเสริมชีวนะขึ้นเองภายในประเทศ ควรมีการตรวจสายพันธุ์ของแบบคทีเรียตั้งต้นก่อนได้รับอนุญาตให้มีการผลิต รวมทั้งไม่อนุญาตให้ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ภายในประเทศนำสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ก่อนได้รับการตรวจคุณภาพและความปลอดภัย รวมทั้งต้องได้รับอนุญาตจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องก่อน
7. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปเผยแพร่ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ ส่งเสริมให้เห็นถึงความจำเป็นของการใช้สารเสริมชีวนะที่ได้รับการควบคุมคุณภาพและผ่านการตรวจสอบอย่างถูกต้องก่อนอนุญาตให้ใช้ได้
8. หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์โดยตรง
   - กรมปศุสัตว์ ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์
   - ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและสถาบันการศึกษาอื่นๆ สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการเรียนการสอนและวางแผนการวิจัยต่อไป
   - สำนักงานอาหารและยา สารเสริมชีวนะสามารถใช้ข้อมูลและเทคโนโลยีเพื่อเป็นแนวทางในการทดสอบความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับคน
9. เทคโนโลยีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยเป็นระดับอะณูชีววิทยาที่ทันสมัย สามารถนำมาถ่ายทอดให้กับเจ้าหน้าที่ของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจ เป็นการพัฒนาความรู้ให้กับบุคลากรของประเทศ
10. ได้นักศึกษาและผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเกี่ยวกับสายพันธุ์และพันธุกรรมการดื้อยาของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะ
11. ผลงานที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ได้เตรียมเป็นสามารถตีพิมพ์ได้ทั้งในวารสารวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเตรียม manuscript

เอกสารอ้างอิง

1. Ahn, C., D. Collins-Thompson, C. Duncan, and M. E. Stiles. 1992. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. Plasmid **27**:169-76.
2. Aminov, R. I., N. Garrigues-Jeanjean, and R. I. Mackie. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Appl. Environ. Microbiol. **67**:22-32.
3. Axelsson, L. T., S. E. Ahrne, M. C. Andersson, and S. R. Stahl. 1988. Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. Plasmid **20**:171-4.
4. Becquet, P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. Int. J. Food Microbiol. **88**:247-54.
5. Bernhard, K., H. Schrempf, and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **133**:897-903.
6. Charpentier, E., G. Gerbaud, and P. Courvalin. 1993. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene *tet*(S) in *Listeria monocytogenes* BM4210. Gene **131**:27-34.
7. Chen, N. Y., S. Q. Jiang, D. A. Klein, and H. Paulus. 1993. Organization and nucleotide sequence of the Bacillus subtilis diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicinolate synthase. J.Biol.Chem. **268**:9448-9465.
8. Coeuret, V., M. Gueguen, and J. P. Vernoux. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. Int. J. Food Microbiol. **97**:147-56.
9. Collins, L. A., and S. G. Franzblau. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicob. Agents Chemother. **41**:1004-1009.
10. Danielsen, M., and A. Wind. 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. **82**:1-11.
11. Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Gueguen. 2002. A PCR-based method for identification of *lactobacilli* at the genus level. FEMS Microbiol. Lett. **214**:271-5.
12. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J. Clin. Microbiol. **33**:24-7.

13. **Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol **67**:1628-35.

14. **Edens, F. W.** 2003. An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. Rev. Bras. Cienc. Avic. **5**:75-97.

15. **Fons, M., T. Hege, M. Ladire, P. Raibaud, R. Ducluzeau, and E. Maguin.** 1997. Isolation and characterization of a plasmid from Lactobacillus fermentum conferring erythromycin resistance. Plasmid **37**:199-203.

16. **Gevers, D., M. Danielsen, G. Huys, and J. Swings.** 2003. Molecular characterization of *tet(*M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1270-5.

17. **Guarner, F., and G. J. Schaafsma.** 1998. Probiotics.

18. **Hoa, N. T., L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P. H. Van, S. Ammendola, E. Ricca, and A. S. Cutting.** 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl Environ Microbiol **66**:5241-7.

19. **Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel, and C. M. Franz.** 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **73**:730-9.

20. **Iwata, M., M. Mada, and H. Ishiwa.** 1986. Protoplast fusion of Lactobacillus fermentum. Appl Environ Microbiol **52**:392-3.

21. **Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, and J. B. Barrett.** 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. J. Clin. Microbiol. **42**:3558-65.

22. **Jenkinson, H. F., R. A. Baker, and G. W. Tannock.** 1996. A bindin-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa- and heptapeptides. J. Bacteriol. **178**:68-77.

23. **Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. J. Clin. Microbiol. **37**:3497-503.

24. **Klare, I., C. Konstabel, G. Werner, G. Huys, V. Vankerckhoven, G. Kahlmeter, B. Hildebrandt, S. Muller-Bertling, W. Witte, and H. Goossens.** 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob. Chemother. **59**:900-12.

25. **Kwon, H. S., E. H. Yang, S. W. Yeon, B. H. Kang, and T. Y. Kim.** 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based

on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. **239**:267-75.

26. **Landman, D., and J. M. Quale.** 1997. Management of infections due to resistant *Enterococci*: a review of therapeutic options. J Antimicrob Chemother **40**:161-70.

27. **Leverstein-van Hall, M. A., A. T. Box, H. E. Blok, A. Paauw, A. C. Fluit, and J. Verhoef.** 2002. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a clinical setting. J. Infect. Dis. **186**:49-56.

28. **Lin, C. F., Z. F. Fung, C. L. Wu, and T. C. Chung.** 1996. Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from *Lactobacillus reuteri* G4. Plasmid **36**:116-24.

29. **Lund, B., and C. Edlund.** 2001. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the vanA gene cluster. Clin Infect Dis **32**:1384-5.

30. **Michael, G. B., P. Butaye, A. Cloeckaert, and S. Schwarz.** 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes Infect **8**:1898-914.

31. **Moellering, R. C., Jr.** 1991. The Garrod Lecture. The *Enterococcus*: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. J Antimicrob Chemother **28**:1-12.

32. **Murray, B. E., and B. Mederski-Samaroj.** 1983. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in *vitro* penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. J Clin Invest **72**:1168-71.

33. **Nakagawa, T., M. Shimada, H. Mukai, K. Asada, I. Kato, K. Fujino, and T. Sato.** 1994. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **60**:637-40.

34. **Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang, and H. Y. Kim.** 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol **100**:1171-85.

35. **Ramesh, V., J. A. Fralick, and R. D. Rolfe.** 1999. Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocecitis with bacteriophage. Anaerobe **5**:69-78.

36. **Reid, G.** 2005. The importance of guidelines in the development and application of probiotics. Curr Pharm Des **11**:11-6.

37. **Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, and T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol **84**:197-215.

38. **SCAN.** 2003. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. July 2001 updated April 2003.

39. **Sutcliffe, J., T. Grebe, A. Tait-Kamradt, and L. Wondrack.** 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2562-6.

40. **Temmerman, R., B. Pot, G. Huys, and J. Swings.** 2001. A quality analysis of commercial probiotic products. Meded Rijksuniv Gent. Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet **66**:535, 537-42.

41. **Vescovo, M., L. Morelli, and V. Bottazzi.** 1982. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. Appl Environ Microbiol **43**:50-6.

42. **von Wright, A.** 2005. Regulating the safety of probiotics--the European approach. Curr. Pharm. Des. **11**:17-23.

43. **Wagner, R. D., and C. E. Cerniglia.** 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of competitive exclusion bacteria applied to newly hatched chickens. Int. J. Food Microbiol. 102:349-53.

44. **Wang, T. T., and B. H. Lee.** 1997. Plasmids in *Lactobacillus*. Crit Rev Biotechnol **17**:227-72.

45. **Werner, G., R. J. Willems, B. Hildebrandt, I. Klare, and W. Witte.** 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. **41**:1499-506.

46. **Wu, X. Y., M. J. Walker, M. Hornitzky, and J. Chin.** 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. J. Microbiol. Methods **64**:107-19.

47. **Yeung, P. S., M. E. Sanders, C. L. Kitts, R. Cano, and P. S. Tong.** 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains. J. Dairy Sci. **85**:1039-51.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ข้อกำหนดเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในพระราชบัญญัติอาหารสัตว์ พ.ศ .2536

กำหนดให้ "สารเสริมชีวนะ" เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์และให้ใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดของสารดังกล่าวตามชื่อทางวิทยาศาสตร์ต่อไปนี้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ได้แก่

1. *Lactobacillus plantarum*
2. *Lactobacillus casei*
3. *Lactobacillus fermentum*
4. *Lactobacillus brevis*
5. *Lactobacillus bulgaricus*
6. *Lactobacillus acidophilus*
7. *Lactobacillus cellobiosus*
8. Lactobacillus curvatus
9. *Lactobacillus delbruekii*
10. *Lactobacillus lactis*
11. *Lactobacillus reuterii*
12. *Lactobacillus helveticus*
13. *Leuconnostoc mesenteroides*
14. *Streptococcus faecium cenelle 68*
15. *Streptococcus thermophilus*
16. *Streptococcus faecium*
17. *Streptococcus cremoris*
18. *Streptococcus diacetylactis*
19. *Streptococcus lactis*
20. *Streptococcus intermedius*
21. *Bacillus subtilis strain BN*
22. *Bacillus coagulan*
23. *Bacillus lentus*
24. *Bacillus lichenifermis*
25. *Bacillus pumilus*
26. *Bacillus subtilis* สเตรนที่ไม่สร้างยาปฏิชีวนะ
27. *Bacillus toyoi*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

28. *Bacteroides amylophilus*
29. *Bacteroides capillosus*
30. *Bacteroides ruminocola*
31. *Bacteroides suis*
32. *Bifidobacterium adolescentis*
33. *Bifidobacterium animalis*
34. *Bifidobacterium bifidum*
35. *Bifidobacterium infantis*
36. *Bifidobacterium longum*
37. *Bifidobacterium thermophilum*
38. *Pediococcus acidilacticii*
39. *Pediococcus cerevisiae domosus*
40. *Pediococcus pentosaceus*
41. *Propionibacterium freudenreichii*
42. *Propionibacterium shermanii*

คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Lactobacillus*

ระบุ genus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Oxomygen requirement											
Strict aerobic	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Strictly anaerobic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Facultative anaerobic/ microaerophilic	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Motility	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	-	+	-	-	-	-	-	w/-	-	-
Growth at 5°C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	-	+	-	-	D	D	?	?	?	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Carbohydrate, acid from											
Arabinose	-	-	-	-	-	D	D	-	-	D	-
Maltose	-	-	+	+	+	+	+	+	d	d	+
Melezitose	-	-	+	-	-	D	-	-	-	D	-
Salicin	-	-	+	-	+	+	-	d	?	D	-
VP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrate reduced	-	-	-	-	-	-	-	+	d	D	+
H_2S production	D	-	-	+	-	-	-	d	-	D	+

1. *Kurthia* spp.
2. *Brochothrix* spp.
3. *Listeria* spp.; *Listerella*
4. *Erysipelothrix* spp.
5. *Lactobacillus*; group I, thermobacteria
6. *Lactobacillus*; group II, streptobacteria
7. *Lactobacillus*; group I, betabacteria
8. Arachnia propionica
9. *Arcanobacterium haemolyticum*; *Corynebacterium haemolyticum*

10. *Actinomyces* spp. 11. *Clostridium perfringens*: *C. welchii*

\+ 85-100% strains are positive (all, most, many, usually).

\- 0-15% strains positive (none, one, few, some)

d 16-84% strains positive (many, several, some)

D Diferent reactions given by lower taxa (genera, species, varieties)

w Weak reaction or growth

w/- Weak reaction or no reaction with different strains: positive reactions are weak or growth is feeble.

ชนิด species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Growth at 5°C	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	?	?	?
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	-	-	-	d	w	-	d	?	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Carbohydrate, acid from														
Arabinose	-	-	-	-	-	-	d	+	d	-	-	d	-	D
Galactose	+	+	d	+	-	-	+	d	-	d	-	+	-	D
Lactose	+	-	d	+	d	d	+	d	-	d	+	+	-	-
Maltose	+	d	d	+	d	-	+	+	-	+	+	+	d	d
Manntitol	-	d	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	D
Melezitose	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	D
Melibiose	d	-	-	+	d	-	+	+	-	-	-	d	-	D
Raffinose	d	-	-	+	d	-	+	d	-	-	-	+	-	D
Salicin	+	+	d	d	+	+	+	-	-	+	-	d	?	D
Sorbital	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	d	-	-
Trehalose	d	+	d	+	d	+	+	-	d	+	-	d	d	D
Asculin hydrolysis	+	+	-	d	+	+	+	d	d	+	-	-	-	D
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	D
Arginine hydrolysis	-	+	d	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

1. *Lactobacillus acidophilus* 2. *L. jenenii* 3. *L. delbrueckii*

4. *L. salivarius* 5. *L. gasseri* 6. *L. casei*

7. *L. plantarum* 8. *L. brevis*

9. *L. fermentum* (not *L. fermenti*, now also include *L. cellobiosuss*)

10. *Listeria monocytogenes*; *Listerella monocytogenes*

11. *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *E. insidiosa*

12. *Arachnia propionica*; *Actinomyces propionicus*

13. *Arcanobacterium haemolyticum*; *Corynebacterium haemolyticum*

14. *Actinomyces* spp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	+	d	-	d
Motility*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3 µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-	-
Growth at 50°C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-		d	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	d	d	d	+	-	-	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anarerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Carbohydrate, acid from																								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Cellubiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
Galactose	-	-		-		d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Mannose	-			d	d	+	d	+	+	+	d	+	d	d	-	+	d	+	+	-	-	+	d	+
Melibiose						d	+	d	d	d	d	+		d	-	+		+	+			d		+
Raffinose							d	+	+	d	+	+		+		+		+	+			d	d	+
Salicin		+	d	d		d	+	+	+	+	+	d	d	d		+	d	+	+			d	+	d
Xylose	-	-	-	-	d		+	+	d	+	d	d				+		+	+			d	+	
ONPG	-		d		-	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+		+	+			d		
Utilization of citrate	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	d	d	-	-	-	-
Urease	-	d	d	-		+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-	-
VP	+	+	+	+		-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	-	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	d	-	+	-	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
Hipprate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	-	d	-	-	-

1. B. anthracis
2. *B. cereus: B. anthracoides*
3. *B. mycoides*
4. *B. thuringiensis*
5. *B. firmus*
6. *B. lentus*
7. *B. megaterium*
8. *B. pumilus*
9. *B. subtilis*
10. *B. licheniformis*
11. *B. amyloliquefaciens*
12. *B. coagulans*
13. *B. pantothenticus*
14. *B. alvei*
15. *B. brevis*
16. *B. circulans*
17. *B. laterosporus*
18. *B. macerans*
19. *B. polymexa*
20. *B. sphaericus*
21. *B. badius*
22. *B. stearothermophilus* (Group I)
23. *B. stearothermophilus* (Group II)
24. *B. stearothermophilus* (Group III)

* All motile species may produce non-motile variants

คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Enterococcus*

Oxidase test	+
Catalase test	+

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Manitol Egg Yolk Polymyxin-B Agar (MYP Agar)

Beef Extract	1.0 g
Peptone	10.0 g
D-Mannitol	10.0 g
NaCl	10.0 g
Agar	15.0 g
Phenol Red 0.2% aq.sol^{n}	15.0 ml
Distilled water	1,000 ml

2. SF-Streptococcus Agar (SF Agar)

Tryptone	20.0 g
Dextrose	5.0 g
K_2PO_4	4.0 g
NaCl	5.0 g
Sodium Azide	0.5 g
Agar	20.0 g
Bromcresol Purple 0.2%aq.sol^{n}	32.0 mg
Distilled water	1,000 ml

3. de Mans Rogosa and Sharpe Agar (MRS Agar)

Proteose peptone	10.0 g
Meat extract	8.0 g
Yeast extract	5.0 g
Tri-ammonium citrate	2.0 g
Sodium acetate	0.5 g
$Mg_2SO_4.7H_2O$	0.1 g
K_2HPO_4	2.0 g
Glucose	20.0 g
Tween-80	1.0 g
Typtone	5.0 g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Agar	20.0 g
Distilled water	1,000 ml

4. Broth sugar (BS

Peptone	10.0 g
Meat extract	3.0 g
NaCl	5.0 g
Bromthymol blue 0.2%aq.sol^{n}	15 ml
Distilled water	1,000 ml

5. Ammonium salt sugar (ASS)

$(NH_4)_2HPO_4$	1.0 g
KCl	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Yeast extract	0.2 g
Bromcresol purple 0.2 %aq.sol^{n}	4 ml
Agar	20.0 g
Distilled water	1,000 ml

6. Buffered Peptone Water (BPW)

Peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	9.0 g
KH_2PO_4	1.5 g
Distilled water	1,000 ml

7. Urea Medium

Peptone	1.5 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
Agar	10.0 g
Phenol red 0.2%aq.sol^{n}	6 ml
Distilled water	1,000 ml

8. Voges Proskauer (VP)

Peptone	7.0 g
Glucose	5.0 g
NaCl	5.0 g
Distilled water	1,000 ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. Nitrate broth media

Peptone	5.0 g
Meat extract	3.0 g
NaCl	5.0 g
KNO_3	1.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1,000 ml

10. Peptone Saline Diluting fluid (PSD)

Peptone	1.0 g
NaCl	8.5 g
Distilled water	1,000 ml

PCR conditions

1. ยีน *gyrA*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
58°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

2. ยีน *parC*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
58°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

3. ยีน *aadE*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
58°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ยีน *tetK*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	} 30 cycles
52°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

5. ยีน *tetL*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	} 30 cycles
55°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

6. ยีน *tetM*

95°C	5	min				
94°C	45	sec	} 30 cycles			
56°C	45	sec				
72°C	45	sec		72°C	7	min

7. ยีน *tetO*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	} 30 cycles
59°C	45	sec	
72°C	1	min	
72°C	7	min	

8. ยีน *tetS*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	} 30 cycles
47°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ยีน *tetW*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
60°C	45	sec	
72°C	1	min	
72°C	7	min	

10. ยีน *vanA*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
53°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

11. ยีน *vanB*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
54°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

12. ยีน *vanC*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
53°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

13. ยีน *ermA*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
48°C	45	sec	
72°C	45	sec	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

72°C	7	min

14. ยีน *ermB*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
50°C	45	sec	
72°C	45	sec	
72°C	7	min	

15. ยีน *ermC*

95°C	5	min	
94°C	45	sec	30 cycles
48°C	45	sec	
72°C	45	sec	

72°C	7	min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Probiotic strains ที่ทำการศึกษาการปรากฏของยีนดื้อยา

ยีน	*Bacillus*	*Lactbacillus*
aadE	*B. cereus* B7.1, *B. cereus* B7.2, *B. cereus* B7.3, *B. subtilis* B7.4, *B. subtilis* cluster B8.6, *B. subtilis* B8.7, *B. subtilis* cluster B10.4, *B. subtilis* cluster B10.6, *B. subtilis* cluster B10.8, *B. subtilis* cluster 10.9, *B. subtilis* cluster B12.2(2), *B. subtilis* cluster B12.3(2), *B. subtilis* cluster B12.4(2), *B. subtilis* cluster B12.5(2), *B. subtilis* cluster B13.1(1), *B. subtilis* cluster B13.2(1), *B. subtilis* B15.2(1), *B. subtilis* B15.3(1), *B. subtilis* B15.1(2), *B. cereus* B15.7(2),	*L. plantarum* L1.1, *L. plantarum* L1.2, *L. plantarum* L1.3, *L. gasseri* L1.4, *L. gasseri* L1.5, *L. delbrueckii* L2.1, *L. plantarum* L2.5, *L. delbrueckii* L7.1, *L. delbrueckii* L7.2, *L. delbrueckii* L7.9, *L. plantarum* L9.1, *L. plantarum* L9.2, *L. delbrueckii* L9.3, *L. plantarum* L9.4,*L. plantarum* L9.5, *L. casei* gr L10.8(1), *L. casei* gr L10.10(1), *L. rhamnosus* L11.1, *L. delbrueckii* L11.2, *L. casei* gr L11.3
tetK	*B. subtilis* B1.1, *B. subtilis* cluster B1.3,	*L. plantarum* L1.1, *L. plantarum* L1.2, *L. plantarum* L1.3,
tetL	*B. licheniformis* B1.4, *B. subtilis* B1.5, *B. subtilis* cluster	*L. gasseri* L1.4, *L. gasseri* L1.5, *L. delbrueckii* L2.1, *L.*
tetM	B2.2, *B. cereus* B7.2, *B. cereus* B7.3, *B. subtilis* B7.4,	*plantarum* L2.4, *L. plantarum* L2.5, *L. plantarum* L2.7,
tetO	*B. subtilis* B8.2(2), *B. subtilis cluster* 8.5(2), *B. subtilis*	*L. delbrueckii* L7.1, *L. delbrueckii* L7.2, *L. delbrueckii* L7.3,
tetS	cluster B9.4(1), *B. Subtilis* B9.5(1), *B. subtilis* B9.6(1),	*L. rhamnosus* L8.1, *L. rhamnosus* L8.2, *L. plantarum* L8.6,
tetW	*B. licheniformis* B10.6(1), *B. subtilis* cluster B10.8(1),	*L. plantarum* L14.5, *L. plantarum* L14.7, *L. plantarum* L14.8,
	B. subtilis cluster B10.9(1), *B. licheniformis* B10.10(1),	*L. plantarum* L14.9, *L. plantarum* L14.10
	B. subtilis cluster B10.14(1), *B. subtilis* cluster	
	B11.18(2), *B. subtilis* cluster B12.3(1),	
ermA,	*B. subtilis* cluster B1.2, *B. subtilis* cluster B10.4(1)	
ermB,	*B. licheniformis* B10.6(1), *B. licheniformis* B10.8(1),	
ermC	*B. subtilis* cluster B10.421), *B. subtilis* cluster B10.5(2),	
	B. subtilis cluster B12.2(1), *B. subtilis* cluster B12.3(1),	
	B. subtilis cluster B12.4(1), *B. subtilis* cluster B12.3(2),	
	B. subtilis cluster B12.4(2), *B. subtilis* cluster B13.6	
VanA,	*B. subtilis* cluster B8.6(1), *B. subtilis* B8.7(1), *B. subtilis*	*L. plantarum* L1.1, *L. plantarum* L1.2, *L. plantarum* L1.3,
vanB,	cluster B10.4(1), *B.licheniformis* B10.6(1), *B. subtilis*	*L. gasseri* L1.4, *L. gasseri* L1.5, *L. delbrueckii* L2.1,
vanC	cluster B10.8(1), *B. subtilis* cluster B10.9(1),	*L. plantarum* L2.4, *L. plantarum* L2.5, *L. plantarum* L2.7,
	B. licheniformis B10.10(1), *B. subtilis* cluster B10.1(2),	*L. delbrueckii* L7.1, *L. delbrueckii* L7.2, *L. delbrueckii* L7.3,
	B. subtilis cluster B12.2(2), *B. subtilis* cluster B12.3(2),	*L. rhamnosus* L8.1, *L. rhamnosus* L8.2, *L. plantarum* L8.3,
	B. subtilis cluster B12.4(2), *B. subtilis* cluster B12.5(2),	*L. gasseri* L8.14, *L. rhamnosus* L8.15, *L. Plantarum* L8.17,
	B. subtilis cluster B13.1(2), *B. subtilis* cluster B13.2(2),	*L. plantarum* L8.18, *L. plantarum* L10.2(1), *L. plantarum*
	B. cereus B15.4(2), *B. cereus* B15.5(2), *B. cereus*	L10.4(1), *L. casei* gr L10.8(1), *L. casei* gr L10.10(1),
	B15.6(2), *B. cereus* B15.7(2), *B. cereus* B15.8(2)	*L. plantarum* L14.9, *L. plantarum* L14.10

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ – นามสกุล) ภาษาไทย) รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

(ภาษาอังกฤษ) Rungtip Chuanchuen

2. เพศ หญิง สถานะทางการสมรส ■ โสด □ สมรส

3. วัน เดือน ปีเกิด 11 กรกฎาคม 2512 อายุ 38 ปี

.4ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ.) ผู้ช่วยศาสตราจารย์

5. ที่อยู่) ที่ทำงาน (ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ (02) 2189578 โทรสาร (02) 2189577

6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 95/136 หมู่ 1 ต.บ้านใหม่

อำเภอสามพราน จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73110

โทรศัพท์ (02) 8058027 โทรสาร -

7. E-mail address: rchuanchuen@yahoo.com

8. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรีสาขา สัตวแพทยศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จ1993 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.03

ปริญญาโทสาขา Animal Sciences (Food safety) สถาบัน Colorado State University

ปีที่สำเร็จ1999 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.75

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium DT104

ปริญญาเอกสาขา Microbiology (Bacterial genetics) สถาบัน Colorado State University

ปีที่สำเร็จ2004 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.53

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ Studies on multidrug efflux systems and triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

อื่นๆ (โปรดระบุ)

Visiting Scientist สถาบัน Colorado State University

เดือน เมษายน 2005 ถึง กรกฎาคม 2005

หัวข้อ Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Bukholderia pseudomallei* and related bacteria

9. ผลงานวิจัยย้อนหลัง 5 ปี (ปี 2002-ปัจจุบัน)

Chuanchuen, R., S. Khemtong, and P. Padungtod. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38(5):855-862 มี impact factor 1.0

Chuanchuen, R., N. Gotoh and H.P. Schweizer. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49(2): 2133-2136. มี impact factor 4.4

Chuanchuen, R., J.B. Gaynor and H.P. Schweizer. Molecular Charaterization of MexL, the transcriptional repressor of the the *mexJK* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49(2): 1844-1851. มี impact factor 4.4

Chuanchuen, R. and H. Schweizer. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely due to efflux. Am. J. Infect.Control. 2003; 31:124-127. มี Impact factor: 2.1

Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. Schweizer. The MexJK efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol. 2002; 184: 5036-5044. มี impact factor 5.0

Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. Schweizer. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. Biotechniques . 2002; 33:760-763. มี impact factor 2.5

ผลงานวิจัยที่กำลังพิจารณาเพื่อตีพิมพ์) under review(

Chuanchuen, R. and W. Wannaprasat. Functional characterization of MexXY and OpmG in aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. (**Submitted**) มี impact factor 1

Chuanchuen, R., W. Wannaprasat, K. Ajariyakhajorna and H.P. Schweizer. Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from *Pseudomonas* mastitis. Microbiol. Immunol. 2007. (**Submitted**) มี impact factor 2.4

Khemtong, S. and R. **Chuanchuen**. Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 among *Salmonella enterica* Isolated from Poultry and Swine. Microb. Drug Resist. 2007. (**Submitted**) มี impact factor 2.4

Chuanchuen, R., P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat and P. Padungtod. Contribution of the proton-dependent efflux systems in reduced susceptibility to disinfectants in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. J. Vet. Med. Sci. 2007. **(Submitted)** มี impact factor 1.0

ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น Proceedings หนังสือ ฯลฯ)

Khemtong, S, P. Pathanasophon and R. Chuanchuen. Identification and Characterization of Antimicrobial Resistance Patterns and Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes among *Salmonella* Strains Isolated from Poultry and Swine in Thailand. The 107rd American Society of Microbiology (ASM) General meeting, Toronto, Ontario, Canada. May 21-25, 2007.

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น อลงกร อมรศิลป์ 2550 หนังสือชุด อาหารปลอดภัย : การตรวจคุณภาพน้ำนม โรงพิมพ์ห้าง กรุงเทพมหานคร 158 หน้า

10. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

-Molecular genetics of bacteria

-Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) ...สพ.ญ. ดร. พรเพ็ญ พัฒนโสภณ .....

   (ภาษาอังกฤษ) ...Dr. Pornpen Pathanasophon .....

   เพศ...หญิง..... อายุ .....52..... ปี

   สถานภาพสมรส ☐ โสด ☒ สมรส

2. การทำงาน

   ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) ...นายสัตวแพทย์ 8 วช. .....

   สถานที่ทำงาน ...สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ...กษตรกลาง จตุจักร .....

   จังหวัด ...กรุงเทพฯ ..... รหัสไปรษณีย์ 10900.....

   โทรศัพท์ ...02-5798908-14 ต่อ 404..... โทรสาร ...02-5798918.....

   e-mail ...pornpen53@hotmail.com.....

3. ที่อยู่ (ที่บ้าน) ...บ้านเลขที่ 9 ซอย 1 หมู่บ้านสวนสน ซอย รามคำแหง 60 แขวงหัวหมาก

   เขต บางกะปิ.....จังหวัด ...กรุงเทพฯ .....รหัสไปรษณีย์ .....10240.....

   โทรศัพท์ ...02-7352853..... โทรสาร .....-.....

   e-mail ... pornpen53@hotmail.com .....

4. ประวัติการศึกษา

   4.1 ปริญญาตรีสาขา...สัตวศาสตร์..... สถาบัน .....มหาวิทยาลัย..เกษตรศาสตร์....

   ที่จบ ...1976.....

   ปริญญาตรีสาขา...สัตวแพทยศาสตร์..... สถาบัน .....มหาวิทยาลัย..เกษตรศาสตร์.....

   ที่จบ ...1978.....

   4.2 ปริญญาโทสาขา ..... สถาบัน .....

   ปีที่จบ .....

   4.3 ปริญญาเอกสาขา ...สัตวศาสตร์.....สถาบัน ...Tokyo University of Agriculture.....

   ปีที่จบ ...1996.....

   4.4 อื่นๆ (ระบุ) .....

   .....

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1) ...Veterinary Microbiology.....

   .....

6. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (โปรดระบุทั้งชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ เล่มที่ เลขหน้า และค่า impact factor)

1.**Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Sawada, T. 1994. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Vet. Microbial. 39:179-185.

2. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T. and Tanticharoenyos, T. 1995. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 24:195-199.

3. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrated in ducks. Avian Patho. 25:705-719.

4. **Pathanasophon, P.**, Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W. and Sawada, T. 2002. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 31:267-270.

5. Songserm, T., Viriyarampa, S., Sae-Heng, N., Chamsingh, W., Bootdee, O. and **Pathanasophon, P.** 2003. *Pasteurella multocida*-associated sinusitis in Khaki Campbell ducks (Anas platyrhynchos). Avian Dis. 47:649-655.

6. Homhuan, A., **Pathanasophon, P.**, Crommelin, D.JA., Jiskoot, W., Kersten, G.FA. and Prakongpan, S. 2004. Characterization and protection in mice of outer membrane proteins from Pasteurella multocida A:1 incorporated in lipid vaccine delivery systems. ScienceAsia 30:231-237.

7. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ) .....

1. Meramitmansook, P., **Pathanasophon, P.**, Tungtrakarnpong, N., Siriwan, C. Neramitmansook, W. and Dumrongsiri, C. 1983. Moraxella bovis from cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. Proceeding, 10th Annual Vet. Conference, Thai Vet. Med. Association. 78-87.

2. **Pathanasophon, P.**, Mepeuj, Y., Tanticharoenyos, T. Akobole, L., Meramitmansook, P. and Sutherat, S. 1984. Swine erysipelas: cases report.. J. Thai Vet. Med. Assoc. 35 (2): 179-184.

3. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Pipitkul, S. 1984. A survey for the prevalence of swine erysipelas. J. Thai Vet. Med. Assoc. 35 (2): 171-177.

4. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T., Pipitkul, S. and Praikanahok, N. 1985. A study on serotypes of *Pasteurella multocida*. J. Thai Vet. Med. Assoc. 36 (4): 385-393.

5. **Pathanasophon, P.**, Sukonthaman, A. Smitanon, J., Methiyapun, S., Chirathaworn, C. and Santivatr, W. 1987. *Streptococcus suis* meningitis in piglets. Their serotypes and zoonotic significance. J. Thai Vet. Med. Assoc. 38 (1): 41-52.

6. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Pramoolsinsap. T., 1990. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 41 (3): 101-106.

7. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Morozumi, T. 1991.Characteristics and antimicrobial susceptibilities of *Pasteurella* (*Moraxella*) *anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Thai J. Hlth. Resch. 5(1) 55-61.

8. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Morozumi, T. 1991. Identification *Pasteurella anatipestifer* by APIZYM. Thai J. Vet. Med. 21(4):235-243.

9. Tanticharoenyos, T. **Pathanasophon, P.** and Sawada, T. **1993.** Certain serotypes of *Pasteurella multocida* in poultry. Thai J. Hlth. Resch. 7(1) 21-26.

10. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, T. and Sawada, T. 1994. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Vet. Microbial. 39:179-185.

11. Mulika, L., **Pathanasophon, P.**, Trongwongsa, L. and Tantichoaroenyos, T. 1996. A case report of an outbreak of concurrent aspergillosis and anatipestifer infection in Babary ducks. Thai J. Vet. Med. 25(1): 67-72.

12. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T. and Tanticharoenyos, T. 1995. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 24:195-199.

13. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Experiments on inactivated new duck syndrome vaccine preparation. Proceeding, 15th annual livestock conference. 96-108.

14. **Pathanasophon,P.**, Tanticharoenyos, T. and Sawadw, T. 1996. Immunogenic component of *Riemerella anatipestifer*. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47 (1): 13-20.

15. **Pathanasophon, P.**, Sawada, T., Pramoolsinsap, T. and Tanticharoenyos, T. and 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrated in ducks. Avian Patho. 25:705-719.

16. **Pathanasophon, P.**, Tanticharoenyos, P. and Satuwpng, I. 1998. Antimicrobial drug resistances of Salmonella species and *Escherichia coli* in food animals. J. Thai Vet. Med. Assoc. 49 (1-3):11-23.

17. **Pathanasophon, P.**, Woraracha, A. and Mulika, L. 2001. Serotypes of *Pasteurella multocida* isolates from swine and dermonecrotic toxin gene detection by PCR. J. Thai Vet. Med. Assoc. 52 (3): 33-41.

18. **Pathanasophon, P.**, Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W. and Sawada, T. 2002. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Patho. 31:267-270.

19. Songserm, T., Viriyarampa, S., Sae-Heng, N., Chamsingh, W., Bootdee, O. and **Pathanasophon, P.** 2003. *Pasteurella multocida*-associated sinusitis in Khaki Campbell ducks (Anas platyrhynchos). Avian Dis. 47:649-655.

20. Homhuan, A., **Pathanasophon, P.**, Crommelin, D.JA., Jiskoot, W., Kersten, G.FA. and Prakongpan, S. 2004. Characterization and protection in mice of outer membrane proteins from Pasteurella multocida A:1 incorporated in lipid vaccine delivery systems. ScienceAsia 30:231-237.

21. รางวัลที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

1. รางวัลดีเด่น เรื่อง " การทดลองผลิตวัคซีนนิวดัคซินโดรมชนิดเชื้อตาย " การประชุมวิชาการ ปศุสัตว์ครั้งที่ 15 ประจำปี 2539 ณ โรงแรมอมารี วอเตอร์เกท ของกรมปศุสัตว์

2. รางวัลชมเชย สาขา สัตวแพทยศาสตร์ เรื่อง " Immunogenic component of *Riemerella anatipestifer* " ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 34 ประจำปี 2539 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย,นาง,นางสาว) ธราดล เหลืองทองคำ

   (ภาษาอังกฤษ) (Mr.,Mrs.,Miss) Taradon Luangtongkum

2. เพศ ชาย สถานะทางการสมรส โสด

3. วัน เดือน ปีเกิด 19 เมษายน2519 อายุ 31 ปี

4. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์,ผศ.,รศ.,ศ.) อาจารย์

5. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 02-2189579 โทรสาร 02-2189577

6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 205/187 หมู่บ้านผาสุก แขวงประเวศ เขตประเวศ

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10250

โทรศัพท์ 3216978-02 โทรสาร -

7. E-mail Address taradon.l@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ 085-1173265

8. ประวัติการศึกษา

   8.1 ปริญญาตรีสาขา สัตวแพทยศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ปีที่สำเร็จ2542 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.63

   8.2 ปริญญาโทสาขา_____สถาบัน_____

   ปีที่สำเร็จ_____คะแนนเฉลี่ยสะสม_____

   หัวข้อวิทยานิพนธ์_____

   8.3 ปริญญาเอกสาขา Veterinary Preventive Medicine สถาบัน The Ohio State University

   ปีที่สำเร็จ2548 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.92

   หัวข้อวิทยานิพนธ์ *Campylobacter* spp. in conventional and organic poultry operations

   8.4 อื่น ๆ (ระบุ)_____

9. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ 2002 ถึงปัจจุบัน

Huang, S., T. Luangtongkum, T.Y. Morishita, and Q. Zhang. 2005. Molecular typing of *Campylobacter* strains using the cmp gene encoding the major outer membrane protein. Foodborne Pathog. Dis. 2:12-23.

Luangtongkum, T., Morishita T.Y., Ison A.J., Huang, S., McDermott, P.F. and Zhang Q. 2006 Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. Appl Environ Microbiol. 72(5):3600-7.

Luangtongkum, T., T.Y. Morishita, A. B. El-Tayeb, A. J. Ison and Qijing Zhang. 2007. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. J Clin Microbiol. 45(2):590-4.

9.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ) เช่น proceeding หนังสือ ฯลฯ(

---

10. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

10.1Pre-harvest food safety

10.2 Mechanism of antimicrobial resistance

11. รางวัลวิจัยที่เคยได้รับ) ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย(

Arnold S. Rosenwald Poster Award, the American Association of Avian Pathologists, the41st Annual Meeting, American Vetrinary Medical Association Conference, Philadelphia, Pensylvania, 2004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย