การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

นางสาวเวชสิริ วรรณประสาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND TRANSFERABILITY OF RESISTANCE GENES OF BACTERIA IN PROBIOTICS FOR FOOD ANIMALS COMMERCIALLY AVAILABLE IN THAILAND

Miss Wechsiri Wannaprasat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารที่มีจำหน่ายในประเทศไทย
โดย	นางสาวเวชสิริ วรรณประสาท
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงศ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ภาวิน ผดุงทศ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวชสิริ วรรณประสาท : การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารที่มีจำหน่ายในประเทศไทย. (ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND TRANSFERABILITY OF RESISTANCE GENES OF BACTERIA IN PROBIOTICS FOR FOOD ANIMALS COMMERCIALLY AVAILABLE IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ขวนชื่น, 90 หน้า.

ศึกษาจำนวน ชนิด และพันธุกรรมการดื้อยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด โดยตรวจระบุ genus และ species ของ *Lactobacillus* (*n* = 97) และ *Enterococcus* (*n* = 7) ด้วยวิธี multiplex PCR *Bacillus* (*n* = 114) ด้วยวิธี ARDRA หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าสำหรับยาปฏิชีวนะจำนวน 12 ชนิด ด้วยวิธี agar dilution ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาในเชื้อที่ดื้อต่อยาสอดคล้องกัน โดยตรวจหาการปรากฏของยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* และ *tetW* ในเชื้อที่ดื้อยา tetracycline ตรวจการปรากฏของยีน *vanA*, *vanB* และ *vanC* ในเชื้อที่ดื้อยา vancomycin เชื้อที่ดื้อยา erythromycin ตรวจยีน *ermA*, *ermB* และ *ermC* และตรวจการปรากฏของยีน *aadE* ในเชื้อที่ดื้อยา streptomycin จากนั้นตรวจหาการปรากฏของ plasmid และทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยวิธี conjugation ผลการศึกษาตรวจพบ *Lactobacillus* จำนวน 4 species คือ *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* และ *L. casei* group เชื้อ *Enterococcus* จำนวน 1 species คือ *E. faecium* และเชื้อ *Bacillus* จำนวน 3 species ได้แก่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* และ *B. subtilis* cluster ซึ่งผลิตภัณฑ์ทุกชนิดมีการระบุชนิดของเชื้อไม่ถูกต้อง เชื้อที่แยกได้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในระดับที่แตกต่างกัน โดย *Lactobacillus* มีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่า *Bacillus* ผลการตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา พบยีน *tetW* และ *vanA* ในเชื้อ *Lactobacillus* อย่างละ 1 เชื้อที่ไม่มี plasmid จึงไม่สามารถถ่ายทอดยีน 2 ชนิดแบบขวางและไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาในเชื้อที่ทดสอบ

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2550

4975573631 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD: Antibiotic resistance/ Resistance transfer/ Genetics of resistance/ Probiotics/ *Bacillus*/ *Enterococcus*/ *Lactobacillus*

WECHSIRI WANNAPRASAT : ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND TRANSFERABILITY OF RESISTANCE GENES OF BACTERIA IN PROBIOTICS FOR FOOD ANIMALS COMMERCIALLY AVAILABLE IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. RUNGTIP CHUANCHUEN, D.V.M, M.Sc., Ph.D., 90 pp.

This study was conducted to investigate species, number and antibiotic resistance of probiotic bacteria isolated from 10 probiotic products that are commercially available for food animals in Thailand. Genus and species of *Lactobacillus* (n = 97) and *Enterococcus* (n = 7) were verified using multiplex PCR and those of *Bacillus* (n = 114) were determined using ARDRA. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) for 12 antibiotics were examined using agar dilution methods. The presence of resistance genes was determined in the isolates with corresponding resistance phenotypes. Tetracycline-resistant strains were screened for *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* and *tetW*. Vancomycin-resistant isolates were tested for *vanA*, *vanB* and *vanC*. The isolates resistant to erythromycin were investigated for *ermA*, *ermB* and *ermC* and those resistant to streptomycin were examined for *aadE*. All of the isolates were detected for the presence of plasmid and the selected resistance isolates were examined for resistance transfer via conjugation. Our results revealed four species of *Lactobacillus* i.e. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* and *L. casei* group, one species of *Enterococcus* i.e. *E. faecium* and three species of *Bacillus* i.e. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. subtilis* cluster. All products were inaccurately labeled in bacteriological term. Antimicrobial susceptibility level of all the isolates varied. *Lactobaillus* showed higher resistance rate than *Bacillus* did. The *tetW* and *vanA* genes were detected in only one *Lactobacillus* isolate each. These two strains did not harbor plasmid so the genes were not horizontally transferred. None of resistance isolates tested could transfer their resistane genes.

Department Veterinary Public Health Student's signature Wechsiri Wannaprasat

Field of study Veterinary Public Health Advisor's signature .....

Academic year 2007

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ข้อตักเตือน และช่วยแก้ไขปรับปรุง ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยและทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่านที่ให้วิชาความรู้ด้านต่างๆ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์รวมถึงให้ความอนุเคราะห์ด้านอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องเชื้อควบคุมในการตรวจหายีนดื้อยา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธาณสุข ที่เอื้ออำนวยเรื่องการดำเนินการด้านเอกสาร ขอขอบคุณ คุณไฉไล คูวัฒนากูล คุณศิรินทิพย์ เข็มทอง คุณชานนท์ เอกภพโยธิน เพื่อนๆ ในภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และครอบครัว ที่คอยให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจที่ดีในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

สารบัญคำย่อ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

สารเสริมชีวนะ..... 7

แบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นสารเสริมชีวนะ..... 8

Lactobacillus..... 8

Bacillus..... 9

Enterococcus..... 10

ข้อกำหนดและการควบคุมการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในต่างประเทศ..... 11

ข้อกำหนดและการควบคุมการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในประเทศไทย..... 12

รายงานการดื้อยาในแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะและปัญหาที่เกี่ยวข้อง..... 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 15

ระยะที่ 1 แยกแบคทีเรียและตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค..... 16

การเก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะ..... 16

การแยกแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* จากสารเสริมชีวนะ..... 18

การตรวจนับจำนวนและเลือกเก็บแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* จากสารเสริมชีวนะ..... 19

การตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* และ *E.coli*. 20

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา..... 21
การตรวจคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา..... 21
การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น..... 21
การตรวจพิสูจน์ยืนยันด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา..... 25
การตรวจยืนยัน *Bacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา..... 27
การตรวจยืนยัน *Lactobacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา..... 30
การตรวจยืนยัน *Enterococcus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา..... 31
ระยะที่ 3 ศึกษารูปแบบและพันธุกรรมการดื้อยา..... 32
ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ..... 32
ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา..... 34
ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา..... 39
ตรวจหาการปรากฏของ plasmid..... 39
การเตรียมแบคทีเรียตัวรับ..... 40
การทำ filter-mating..... 40
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย..... 42
การแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อจากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์..... 42
ชนิดและจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์..... 47
การปนเปื้อน *Salmonella* และ *E.coli*..... 50
ความไวต่อยาปฏิชีวนะ..... 50
การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา..... 53
ความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา..... 54
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 58
รายการอ้างอิง..... 69
ภาคผนวก..... 79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายละเอียดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะตามที่ระบุบนฉลาก..... 17

ตารางที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP..... 20

ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์ยืนยัน *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* 26

ตารางที่ 4 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย..... 33

ตารางที่ 5 primers ที่ใช้ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา..... 35

ตารางที่ 6 เชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้..... 43

ตารางที่ 7 เชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้..... 46

ตารางที่ 8 ผลการตรวจชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะ..... 49

ตารางที่ 9 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Bacillus*..... 51

ตารางที่10 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Lactobacillus*..... 51

ตารางที่11 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Bacillus* ที่มี plasmid..... 55

ตารางที่12 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* ที่มี plasmid..... 56

ตารางที่13 ค่าความไวต่อยาปฏิชีวนะของ spontaneous resistant ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus*..... 57

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *L.delbrueckii*…….. 8

รูปที่ 2 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Bacillus*…….. 9

รูปที่ 3 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Enterococcus*……... 10

รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย..... 15

รูปที่ 5 โคโลนีของ *Salmonella* และ *E. coli*…… 21

รูปที่ 6 รูปแบบ ARDRA ของ *Bacillus* spp…… 29

รูปที่ 7 ภาพเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ..... 24

รูปที่ 8 รูปแบบ ARDRA ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Bacillus*…….. 44

รูปที่ 9 ภาพเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ…….. 45

รูปที่ 10 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* ด้วยวิธี multiplex PCR…… 46

รูปที่ 11 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* ด้วยวิธี multiplex PCR……... 47

รูปที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ..... 52

รูปที่ 13 การปรากฏของยีน *tetW* และ *vanA*…… 53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญคำย่อ

AMP	ampicillin
ASS	Ammonium salt sugar
B.	*Bacillus*
bp	base pair(s)
BPW	Buffered Peptone Water
^{O}C	degree(s) Celcius
CFU	Colony Forming Unit
CHP	chloramphenicol
CIP	ciprofloxacin
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
E.	*Escherichia*
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ERY	erythromycin
GEN	gentamicin
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCl	hydrochloric acid
KM	kanamycin
L.	*Lactobacillus*
LB	Luria-Bertani medium
log	logarithmic growth phase
M	molar
mM	millimolar
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter
MRS	de Mans Rogosa and Sharpe Agar
MYP	Manitol Egg Yolk Polymyxin-B Agar
NEO	neomycin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

P.	*Pseudomonas*
PCR	polymerase chain reaction
PSD	Peptone Saline Diluting fluid
r	resistance/resistant
RIF	rifampicin
S.	*Salmonella*
SCAN	Scientific Committee on Animal Nutrition
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF	SF-Streptococcus Agar
STR	streptomycin
TET	tetracycline
tet	tetracycline-resistance encoding gene
TRI	Trimethoprim
µl	microlitter
µM	micromolar
µg	microgram(s)
VAN	vancomycin
VP	Voges Proskauer
%	percentage

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อดื้อยาจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ ที่เป็นปัญหาสำคัญทั้งทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ สาเหตุของการเกิดเชื้อดื้อยามีหลายประการ เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์ การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นเพื่อการป้องกันโรคในสัตว์ เป็นต้น โดยสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ซึ่งการได้รับยาปฏิชีวนะในระดับต่ำติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน เป็นการเพิ่มโอกาสให้เชื้อพัฒนาความดื้อยา (Boerlin et al., 2001) จากการศึกษาของ Lin และคณะ (2006) พบว่าการผสมยา tylosin ในปริมาณ 0.5 กรัมต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในไก่อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้พบเชื้อ *Campylobacter* ที่ดื้อต่อยา erythromycin เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบยีน *emtA* ที่ควบคุมการดื้อต่อยา avilamycin ในเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับยา avilamycin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตอีกด้วย (Delsol et al., 2005) โดยเชื้อที่สัมผัสกับยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องจะพัฒนาการดื้อยาได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์บนโครโมโซมหรือมีการแพร่กระจายตัวระบุการดื้อยา เช่น integrons, transposons, plasmid ที่มียีนดื้อยา เป็นต้น ซึ่งการถ่ายทอดยีนดื้อยาอาจเกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรีย species เดียวกันหรือต่าง species นอกจากนี้แบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งยังสามารถพัฒนาการดื้อยาข้าม (cross-resistance) ไปยังยาชนิดอื่นๆ ได้ (Woodford et al., 1995) รวมถึงคัดเลือกยีนดื้อยาอื่นๆที่อยู่บนตัวระบุการดื้อยาเดียวกัน ส่งผลให้เชื้อดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันทั้งที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดแล้วก็ตาม ตัวอย่างเช่น ปัจจุบันได้มีการห้ามใช้ยา chloramphenicol ในการเลี้ยงสัตว์เพื่อบริโภค แต่ยังสามารถแยกพบเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* enterica ที่ดื้อต่อยาชนิดนี้ได้จากสัตว์ เนื่องจากยีน *cmlA* และ *aad* ที่ควบคุมการดื้อต่อยา chloramphenicol และ streptomycin มักปรากฏอยู่บน class1 integrons เดียวกัน ดังนั้นการใช้ยา streptomycin จะคัดเลือก class1 integrons ที่มียีน *aad* พร้อมกับยีน *cmlA* ทำให้เชื้อยังคงดื้อต่อยา chloramphenicol ทั้งที่ไม่มีการใช้ยานี้แล้ว (Chiu et al., 2006) ซึ่งเชื้อดื้อยาเหล่านี้อาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ สิ่งแวดล้อม และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *S. enterica*, *E. coli* และ *C. jejuni* เป็นต้น เมื่อมนุษย์ติดเชื้อเหล่านี้จะส่งผลให้ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Donabedian et al., 2003)

เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ส่งผลให้องค์กรต่างๆ ได้วางมาตรการป้องกันและแก้ไขปัญหา เช่น เมื่อปี 2540 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้แนะนำว่า ควรยกเลิกการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในกรณีที่มีการใช้ยานั้นเพื่อการรักษาโรค หรือการใช้ยาดังกล่าวอาจก่อให้เกิดการดื้อยาข้ามกับยาที่ใช้ในมนุษย์ได้ ต่อมาในปี พ.ศ. 2549 สหภาพยุโรปได้เพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคทั้งหมด ส่งผลให้ประเทศผู้ส่งออกหลายประเทศตื่นตัวและเตรียมพร้อมกับสถานการณ์ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น เนเธอร์แลนด์ ได้ออกกฎหมายห้ามนำยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคในมนุษย์มาใช้เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ (ศศิ, 2003) Codex ได้ออก code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance เพื่อลดปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาที่มีสาเหตุจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ โดยสนับสนุนให้มีการวางแผนการควบคุมป้องกันเชื้อดื้อยาอย่างมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับพร้อมทั้งส่งเสริมให้มีการศึกษากลไกและระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อดื้อยา ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีการยกปัญหาเชื้อดื้อยาและการควบคุมเชื้อดื้อยาภายในประเทศมาใช้ในการกำหนดเงื่อนไขทางการค้าระหว่างประเทศในอนาคต สำหรับประเทศไทยในฐานะผู้ส่งออกจำเป็นต้องปฏิบัติตามและเตรียมพร้อมเพื่อรับมือกับการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นเช่นกัน โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ประกาศยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคทั้งหมด พร้อมทั้งร่างแนวทางการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาสำหรับยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ในสัตว์เหล่านี้ โดยผู้ผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวจะต้องนำข้อมูลการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยามาประกอบการขอขึ้นทะเบียนยาใหม่

ในปัจจุบัน การใช้สารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก ซึ่งได้มีการพัฒนาและผลิตสารเหล่านี้ออกสู่ท้องตลาด เช่น กรดอินทรีย์ สมุนไพร วิตามิน แร่ธาตุ อย่างไรก็ตามยังไม่มีสิ่งทดแทนยาปฏิชีวนะชนิดใดออกมามีบทบาทและประสิทธิภาพอย่างชัดเจนประกอบกับการสนับสนุนการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์ ทำให้สารเสริมชีวนะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น (Trafalska and Grzybowska, 2004) โดยทั่วไปสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ประกอบด้วย จุลินทรีย์มีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องเป็นชนิดและสายพันธุ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยตาม Generally Regarded As Safe (GRAS) และมีจำนวนจุลินทรีย์ที่เหมาะสมตามที่กำหนด ซึ่งในสหภาพยุโรป การผลิตและการใช้สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเข้มงวดของ the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) ตามแนวทางที่ระบุใน Regulation 1831/2003 EU

(Becquet, 2003; von Wright, 2005) โดยให้ความสำคัญที่ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้สารเสริมชีวนะกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและเน้นการทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์ คนและสิ่งแวดล้อม สาเหตุสำคัญที่ SCAN ควบคุมสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อย่างเข้มงวด คือ จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะอาจเป็นเชื้อดื้อยาแบบที่สามารถถ่ายทอดได้ โดยจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะที่อาจก่อปัญหาการแพร่กระจายเชื้อดื้อยามากที่สุด คือ แบคทีเรีย (Kastner et al., 2006) ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus, Bacillus* และ *Enterococcus* จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะดื้อต่อ tetracycline, erythromycin, penicillin, vancomycin และ tylosin (Wagner and Cerniglia, 2005) ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *Lactobacillus* spp. นั้นดื้อต่อ tetracycline, vancomycin, fluoroquinolones, fusidic acid และ clindamycin โดยที่เชื้อสามารถถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ tetracycline ไปยัง *Lactobacillus* ต่าง species ได้ (Danielsen and Wind, 2003) นอกจากนี้ *Enterococcus* เช่น *E. faecium* และ *E. faecalis* บางสายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและเป็นเชื้อดื้อยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อต่อยา vancomycin (Wegener et al., 1999) ดังนั้นการนำ *Enterococcus* มาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะจึงต้องให้ความสำคัญต่อการระบุ species ที่ถูกต้อง (Murray, 1990)

นอกจากประเด็นเชื้อดื้อยาแล้วยังพบว่าปัญหาที่พบบ่อยอีกประการหนึ่งคือ ปัญหาด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะ โดยมีการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะส่วนใหญ่ที่ระบุบนฉลากว่าเป็น *B. subtilis* นั้น เมื่อทดสอบทางห้องปฏิบัติการแล้วพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* ในspeciesอื่นๆ เช่น *B. clausii, B. pumilus* และ *B. cereus* (Green et al., 1999) เช่นเดียวกับการศึกษาคุณภาพของสารเสริมชีวนะที่มี *Lactobacillus* เป็นส่วนประกอบ พบว่า species ที่ตรวจพบนั้นไม่ตรงกับข้อมูลที่แสดงบนฉลากผลิตภัณฑ์ (Hamilton-Miller et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะบางชนิดนั้นมีจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตน้อยกว่าที่ระบุบนฉลาก (Hong et al., 2005) ซึ่งประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะขึ้นกับสายพันธุ์และจำนวนเชื้อที่ร่างกายได้รับ ดังนั้นการใช้สารเสริมชีวนะที่มีปัญหาเหล่านี้อาจไม่ก่อให้เกิดประโยชน์จริงต่อร่างกายสัตว์ตามที่กล่าวอ้าง

ดังนั้นการใช้สารเสริมชีวนะที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งความปลอดภัยในด้านการถ่ายทอดยีนดื้อยา อาจก่อให้เกิดปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต่อไปได้ ซึ่งการตรวจสอบความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะโดยการ

ทดสอบความไวต่อยาด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum Inhibition Concentration, MIC) นั้นไม่เพียงพอต่อการยืนยันความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (Coeuret et al., 2004) จำเป็นต้องมีการระบุ species ของแบคทีเรียที่ใช้อย่างถูกต้องก่อนการผลิตด้วยร่วมกับการศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและทดสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยา (SCAN, 2003) รวมถึงการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* และ *E. coli* ที่ไม่เพียงแต่เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญแต่ยังพบการดื้อยาและเป็นสาเหตุการแพร่กระจายยีนดื้อยาได้ (Rao et al., 2008) โดยโอกาสการตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิดนั้น มีไม่มาก เพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แต่อาจพบการปนเปื้อนได้กรณีที่สารเสริมชีวนะนั้นผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งเชื้อเหล่านี้อาจก่อโรคโดยตรงหรือเป็นแหล่งของการแพร่กระจายตัวระบุการดื้อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง class 1 integrons ที่พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้บางตัวไม่ได้รับการรับรองความปลอดภัยจาก SCAN ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศ ซึ่งยังไม่มีการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยอย่างจริงจังและเป็นระบบ มีเพียงการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคหรือเท่านั้น แต่ยังไม่มีการตรวจคุณภาพของเชื้อที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะในแง่ของการเป็นสาเหตุการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา รวมถึงพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ได้กำหนดเพียงชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะเท่านั้นและไม่มีการกำหนดวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบ นอกจากนี้การศึกษาเรื่องสารเสริมชีวนะในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้านประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะในแง่ของความเป็นไปได้ที่จะเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณภาพด้านความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในกรณีของการเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา ซึ่งเนื้อหาการวิจัยครอบคลุมถึง

- การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* เพื่อทราบว่าเป็นชนิดที่เคยมีรายงานการเป็นเชื้อดื้อยาและสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาหรือไม่ รวมทั้งเป็นการยืนยันความถูกต้องของการระบุฉลากผลิตภัณฑ์ด้วย

- การศึกษารูปแบบการดื้อยาและพันธุกรรมการดื้อยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ตามแนวทางปฏิบัติของ SCAN โดยทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ทราบแล้วและทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

- การตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* และ *E. coli* ที่นอกจากจะเป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญแล้ว ยังพบการดื้อยาในเชื้อดังกล่าวบ่อยครั้งและอาจเป็นตัวการสำคัญของการแพร่กระจายยีนดื้อยาได้

ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะแสดงถึงคุณภาพและความปลอดภัยด้านเชื้อดื้อยาของสารเสริมชีวนะบางชนิดที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำข้อมูลเรื่องชนิดและจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบไปประกอบการกำหนดแนวทางการตรวจคุณภาพแบคทีเรียก่อนนำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ และประกอบแนวทางการควบคุมขั้นตอนการผลิตให้ได้มาตรฐาน รวมถึงข้อมูลด้านการดื้อยาและพันธุกรรมการดื้อยาสามารถนำใช้ประกอบการวางแนวทางการป้องกันปัญหาการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาที่อาจมีสาเหตุมาจากสารเสริมชีวนะและเป็นข้อมูลพื้นฐานของการค้นคว้าวิจัยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ว่าตรงตามที่ระบุบนฉลากและเป็นชนิดที่เคยมีรายงานว่าเป็นเชื้อดื้อยาและสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาหรือไม่
2. เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาและพันธุกรรมการดื้อยาของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์
3. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์
4. เพื่อศึกษาการปนเปื้อนและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* และ *E. coli* ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเชิงพรรณนา (descriptive study) และมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการเป็น 4 ระยะคือ

1. แยกแบคทีเรียและตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค
2. ตรวจพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา
3. ศึกษารูปแบบและพันธุกรรมการดื้อยา
4. ศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ด้านองค์ความรู้ใหม่

ผลการศึกษาครั้งนี้จะได้ข้อมูลพันธุกรรมการดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ซึ่งสามารถนำไปประกอบการคัดเลือกชนิดแบคทีเรียที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ รวมทั้งได้ plasmid ที่มียีนดื้อยา สามารถนำไปใช้ในการวิจัยแนวลึกเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาต่อไป

2. ด้านการนำไปใช้

2.1 ทราบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในสารเสริมชีวนะ สอดคล้องกับที่ระบุบนฉลากและมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือดื้อยาหรือไม่ สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการกำหนดแนวทางการตรวจคุณภาพแบคทีเรียก่อนนำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ และการควบคุมขั้นตอนการผลิต

2.2 ทราบพันธุกรรมการดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ของการเกิดปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาที่อาจเกิดจากการใช้สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้สารเสริมชีวนะที่ได้รับการควบคุมและผ่านการตรวจสอบอย่างถูกต้อง และใช้ประกอบการวางแนวทางการป้องกันปัญหาการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาที่อาจมีสาเหตุมาจากสารเสริมชีวนะต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สารเสริมชีวนะ

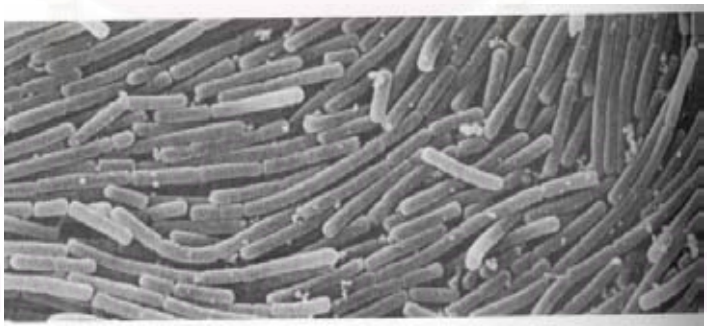
องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) ได้ให้นิยามของสารเสริมชีวนะไว้ว่า สารเสริมชีวนะ คือ จุลินทรีย์มีชีวิตที่ให้เข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการกินในปริมาณที่เหมาะสมแล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย (Guarner and Schaafsma, 1998; Reid, 2005) โดยจำนวนเชื้อที่ก่อประโยชน์ต่อสุขภาพต้องมีอย่างน้อย 10^7 CFU ml/g (Jayamanne and Adams, 2006; Ross et al., 2005) จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจเป็น รา ยีสต์ หรือแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีคุณสมบัติที่ช่วยให้สัตว์มีสุขภาพดี สามารถย่อยอาหารและนำอาหารไปใช้ได้ดีขึ้น เมื่อร่างกายได้รับจุลินทรีย์เสริมชีวนะเข้าไปจุลินทรีย์เหล่านี้จะแย่งอาหารและพื้นที่ผิวของลำไส้กับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เป็นผลให้จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคลดลง ส่วนจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะบางชนิดที่สามารถสร้างกรด เช่น แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) จะทำให้ความเป็นกรดด่างของลำไส้ลดลง ส่งผลให้สภาพแวดล้อมภายในลำไส้ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเชื้อก่อโรคและทำให้เชื้อก่อโรคตายได้ในที่สุด นอกจากนี้จุลินทรีย์หลายชนิดยังสามารถสร้างวิตามินและเอนไซม์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ได้ (Parvez et al., 2006)

แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ แบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus* spp. เช่น *L. plantarum, L. acidophilus* และ *L. rhamnosus* แบคทีเรียจำพวก *Enterococcus* spp. เช่น *E. faecium* และแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* var *toyoi*, *B. licheniformis* และ *B. subtilis* (Tannock, 1999) ซึ่งสามารถเตรียมได้จากแบคทีเรียบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด (Rolfe, 2000) การเลือกชนิดแบคทีเรียที่จะนำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะนั้นขึ้นกับประโยชน์ของเชื้อต่อสุขภาพของโฮสต์เป็นหลัก (Saarela et al., 2000; Teusink et al., 2006) โดยต้องมีคุณลักษณะ ดังนี้ 1) มีความปลอดภัยตามมาตรฐาน Generally Regarded As Safe (GRAS) 2) มีชีวิตอยู่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 3) มีผลต่อร่างกายตรงข้ามกับแบคทีเรียก่อโรค 4) ทนต่อสภาวะภายในร่างกายได้ เช่น การถูกย่อยด้วยน้ำย่อยหรือกรดในกระเพาะอาหาร 5) สามารถยึดเกาะกับเยื่อบุลำไส้ของโฮสต์ได้ (Begley et al., 2005; Lin et al., 2006; Macfarlane and Cummings, 2002; Vesterlund et al., 2005)

2. แบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

2.1 *Lactobacillus*

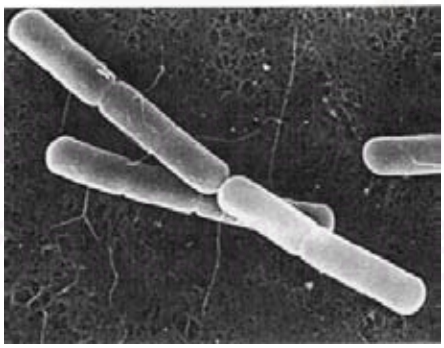
Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (รูปที่ 1) สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย จึงจัดเป็นทั้งแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe และ microaeroplilic โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acld bacteria (LAB) มีทั้งหมด 135 species และ 27 subspecies ซึ่ง *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะมากที่สุด (Yeung et al., 2002) โดยชนิดที่สหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้นั้น ได้แก่ *L. acidophilus*, *L.* casei, *L. farciminis*, *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* (Coeuret et al., 2004) สำหรับประเทศไทย *Lactobacillus* ที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 มีทั้งหมด 12 ชนิด คือ *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. acidoplilus*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbruekii*, *L. lactis*, *L. reuterii* และ *L. helveticus* สำหรับการจัดกลุ่มเพื่อแบ่ง species หรือ subspecies นั้นยังไม่แน่นอน เนื่องจาก *Lactobacilllu*s แต่ละ species นั้นมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ข้อมูลเหล่านี้จึงมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา มีการศึกษาพบว่า การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (phenotypic test) ร่วมกับวิธีทางชีวโมเลกุล (genotypic test) นั้นสามารถระบุชนิดของ *Lactobacillus* ได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น (Bernardeau et al., 2007) โดยวิธี multiplex PCR เป็นวิธีที่สามารถระบุ species ของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะได้ง่าย รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ (Sul et al., 2007)



รูปที่ 1 ภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *L.delbrueckii*
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Prescott et al., 1993)

2.2 *Bacillus*

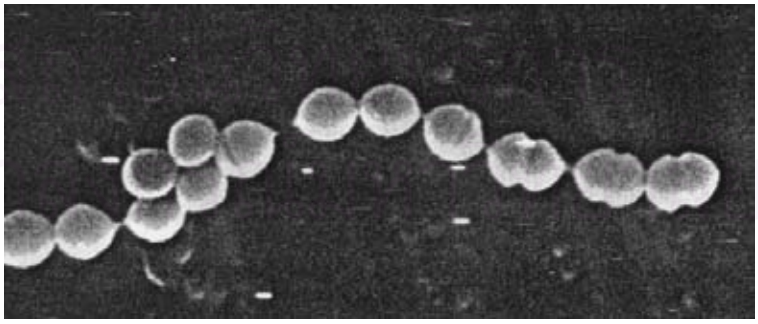
Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (รูปที่ 2) สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จึงจัดเป็นแบคทีเรียชนิด obligate หรือ facultative aerobe พบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ในปัจจุบันมีประมาณ 60 species บาง species เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ได้ เช่น *B. cereus* และ *B. anthracis* (Sorokulova et al., 2006) ส่วนบางspecies เช่น *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ ผลิตยาปฏิชีวนะ รวมถึงสารเสริมชีวนะได้ (Kritas et al., 2006) ในสหภาพยุโรป อนุญาตให้ใช้ *B. cereus* var *toyoi* และ *B. subtilis* ในการผลิตสารเสริมชีวนะได้ โดยให้เหตุผลว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ปลอดภัยต่อสัตว์เพราะไม่สร้างสารพิษและยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดยีนดื้อยาได้ (SCAN, 2000; SCAN, 2001) สำหรับประเทศไทย *Baillus* ที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 มีทั้งหมด 4 ชนิด คือ *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* โดยทั่วไปสามารถระบุ species ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (selective media) ร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมี แต่วิธีเหล่านี้ต้องใช้เวลานานและระบุ species ได้ไม่แม่นยำ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางอณุชีววิทยาเข้ามาใช้ เช่น Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ที่สามารถระบุspeciesของ *Bacillus* ได้สะดวกและมีความแม่นยำสูง (Wu et al., 2006)



รูปที่ 2 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Bacillus*
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Prescott et al., 1993)

2.3 *Enterococcus*

Enterococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (รูปที่ 3) สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จึงจัดเป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม LAB ที่เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptococcus* กลุ่ม D จนในปี พ.ศ. 2527 ได้มีการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของเชื้อกลุ่มนี้พบว่ามีความแตกต่างกับเชื้อ *Streptococcus* จึงจัดเป็น genus ใหม่คือ *Enterococcus* เชื้อกลุ่มนี้พบได้ในดิน แหล่งน้ำ รวมถึงในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มี 2 species คือ *E. faecalis* พบได้ 90-95% และ *E. faecium* พบได้ 5-10% (Franz et al., 1999) การระบุ species ของ *Enterococcus* ด้วยการแยกเชื้อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถแยก genus นี้ออกจากแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมชนิดอื่นได้ (Ke et al., 1999) รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีนั้นต้องใช้ระยะเวลานาน 24 – 48 ชั่วโมง (Kellogg et al., 1994) และแยก species ได้ไม่แม่นยำ เนื่องจากบาง species ไม่มีลักษณะที่ชัดเจนทางชีวเคมี (Singer et al., 1996) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ (Murray, 1990) ดังนั้นการนำ *Enterococcus* มาใช้เป็นสารเสริมชีวนะจึงต้องให้ความสำคัญในการระบุ species ที่ถูกต้องเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (Eaton and Gasson, 2001; Franz et al., 1999; Klein et al., 1998) รวมทั้งการระบุ species ของ *Enterococcus* มีความสำคัญมากในการศึกษาเรื่องระบาดวิทยา การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รวมถึงการนำมาใช้ทางอุตสาหกรรมการผลิตสารเสริมชีวนะ (Kuhn et al., 1995) ในปัจจุบันวิธีที่ได้รับการพัฒนาสำหรับการระบุ genus และ species ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ multiplex PCR เนื่องจากรวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำสูง (Jackson et al., 2004)



รูปที่ 3 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Enterococcus*
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Precotts et al., 1993)

3. ข้อกำหนดและการควบคุมการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในต่างประเทศ

ในยุโรป มีการควบคุมการผลิตและการใช้สารเสริมชีวนะอย่างเข้มงวดโดย SCAN จุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะในสัตว์นั้นต้องผ่านการทดสอบตามแนวทางที่ระบุใน Regulation (EC) No. 1831/2003 ที่กำหนดว่าการใช้สารเสริมชีวนะในสัตว์นั้นต้องมีความปลอดภัยต่อสัตว์และไม่ส่งผลเสียต่อมนุษย์ โดยมีประเด็นหลักอยู่ที่การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ โดยเชื้อที่จะใช้เป็นสารเสริมชีวนะต้องไม่มียีนดื้อยาบน plasmid ที่สามารถถ่ายทอดได้ (Saarela et al., 2000) ซึ่งการยอมรับสารเสริมชีวนะของ SCAN จะขึ้นกับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์จากผู้ผลิตและการที่ไม่เคยมีรายงานถึงอันตรายที่เกิดจากเชื้อนั้น (von Wright, 2005) การตรวจสอบความปลอดภัยสารเสริมชีวนะโดย SCAN ประกอบด้วย การตรวจหารูปแบบการดื้อยา การตรวจหายีนดื้อยา และการถ่ายทอดยีนดื้อยา นอกจากนี้ข้อกำหนดดังกล่าวยังครอบคลุมถึงการควบคุมฉลากผลิตภัณฑ์ ที่ต้องระบุข้อมูลวันหมดอายุ วิธีการใช้ ชนิด และจำนวนแบคทีเรียที่เป็นส่วนประกอบ (CFU/gram) โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์นั้นจะต้องมีคุณสมบัติตามมาตรฐาน GRAS ตามข้อกำหนดของ Food and Drug Administration (FDA) ของสหรัฐอเมริกา (U.S. FDA, 2002) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์

ในปี 2005 European Food Safety Authority (EFSA) ได้ออกข้อกำหนด The qualified presumption of safety (QPS) เพื่อควบคุมคุณภาพของจุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบหรือใช้เป็นอาหาร โดยมีวัตถุประสงค์และแนวทางการควบคุมเช่นเดียวกับ GRAS (EFSA, 2005) ระบุให้มีการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่มีแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบโดยให้ความสำคัญเกี่ยวกับพันธุกรรมการดื้อยาของเชื้อนั้นๆ และเน้นการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียเสตรนต่างๆ การประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยา รวมถึงการควบคุมคุณภาพ บรรจุภัณฑ์ และข้อมูลบนฉลากของผลิตภัณฑ์เสริมชีวนะ ซึ่งข้อมูลบนฉลากจะต้องแสดงชนิดของเชื้อ จำนวนเชื้อ วิธีการใช้ ระยะการเก็บ และวันหมดอายุ (EFSA, 2005) ทั้งนี้ข้อกำหนดของ SCAN และ EFSA มีจุดประสงค์เดียวกัน คือ เพื่อควบคุมความปลอดภัยและการใช้สารเสริมชีวนะในสัตว์และมนุษย์

4. ข้อกำหนดและการควบคุมการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ในประเทศไทย

ในประเทศไทย สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้รับความสนใจมากขึ้น เป็นผลมาจากการที่สหภาพยุโรปได้ประกาศเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ซึ่งขณะนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ประกาศยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคทั้งหมด พร้อมทั้งร่างแนวทางการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยาสำหรับยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ในสัตว์เหล่านี้ โดยผู้ผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวจะต้องนำข้อมูลการประเมินความเสี่ยงเชื้อดื้อยามาประกอบการขอขึ้นทะเบียนยาใหม่

ในปัจจุบันข้อมูลสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยยังไม่สมบูรณ์และยังไม่มีการจัดเก็บข้อมูลอย่างเป็นระบบจึงไม่สามารถระบุจำนวนที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยได้ ตามที่ระบุใน Veterinary and Animal Health Products Directory (APHA, 2004) มีสารเสริมชีวนะที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 8 ชนิด (ในที่นี้ ชนิด หมายถึงชื่อการค้า) อย่างไรก็ตามบางชนิดได้เลิกการผลิตไปแล้ว ในขณะที่มีหลายชนิดที่นำเข้าหรือผลิตขึ้นมาใหม่และอาจเป็นไปได้ว่าสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคมีจำหน่ายในประเทศไทยมีประมาณ 30 ชนิด

สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทยอยู่ภายใต้การควบคุมของกรมปศุสัตว์ โดยสารเสริมชีวนะจัดเป็นหนึ่งในวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามพระราช-บัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ซึ่งผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ได้นั้นต้องขึ้นทะเบียนกับกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้สารเสริมชีวนะเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ โดยแบคทีเรียที่ได้รับอนุญาตให้ผลิตเป็นสารเสริมชีวนะมีทั้งหมด 42 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bateroides*, *Bifidobacyerium*, *Pediococcus* และ *Propionibacterium* (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก) ซึ่งอาจใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ โดยใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปเพื่อจำหน่ายในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า $1x10^5$ CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้นั้นต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ ในกรณีที่ต้องการหาเชื้อสายพันธุ์ใหม่มาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ ต้องมีการพิสูจน์ให้เห็นถึงความปลอดภัยอย่างชัดเจนเสียก่อน อย่างไรก็ตามยังไม่มีการกำหนดแนวทางการทดสอบที่ชัดเจน

5. รายงานการดื้อยาในแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะและปัญหาที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ LAB ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายในประเทศแถบยุโรปจำนวน 55 ผลิตภัณฑ์ โดยคณะผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อได้ 187 สายพันธุ์ พบเชื้อที่ดื้อต่อยา kanamycin, vancomycin, tetracycline, penicillin G และ chloramphenicol คิดเป็น 79, 65, 26, 23 และ 11% ตามลำดับ โดยที่ 68.4% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน (Temmerman et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Danielsen และ Wind (2003) พบว่า *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้นดื้อต่อ vancomycin ในระดับสูง นอกจากนี้ *Lactobacillus* บาง species ยังดื้อต่อ bacitracin, cefoxitin, ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, gentamycin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/sulphamethoxazole และ vancomycin โดยพันธุกรรมอยู่แล้ว โดยก่อนหน้านี้ Teuber และคณะ (1999) ศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม LAB พบการปรากฏของยีนดื้อยาและ plasmid ที่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียกลุ่ม LAB ชนิดอื่นได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* อย่างน้อย 25 species มี plasmid โดยธรรมชาติและพบว่า เชื้อสเตรนหนึ่งสามารถมี plasmid ได้หลายชนิด ถ้า plasmid เหล่านี้มียีนดื้อยาก็จะเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้ ที่ผ่านมามีรายงานการตรวจพบ R-plasmids ที่มียีนดื้อยา tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, macrolide-lincomycin และ streptomycin ใน *L. reuteri* (Axelsson et al., 1988; Lin et al., 1996; Tannock, 1999; Vescovo et al., 1982) *L. fermentum* (Fons et al., 1997; Iwata et al., 1986) *L. acidophilus* (Vescovo et al., 1982) และ *L.* plantarum (Ahn et al., 1992; Danielsen and Wind, 2003) ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ เนื้อดิบและอุจจาระด้วย (Wang and Lee, 1997)

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* บางสายพันธุ์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้นสามารถถ่ายทอดยีน *tetB* ซึ่งควบคุมการดื้อต่อ tetracycline ได้ (Hong et al., 2005) ในทำนองเดียวกัน การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *B. cereus* สามารถถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการดื้อต่อ tetracycline ไปยัง *B. subtilis* และยีนสามารถคงอยู่ได้ในแบคทีเรียตัวใหม่นี้ (Bernhard et

al., 1978) นอกจากนี้ SCAN (2000) ยังเสนอว่าการใช้ *B. licheniformis* เป็นสารเสริมชีวนะนั้นไม่ปลอดภัย เนื่องจากเสี่ยงต่อการถ่ายทอดการดื้อต่อ erythromycin (Hoa et al., 2000)

สำหรับ *Enterococcus* มีคุณสมบัติดื้อยาโดยพันธุกรรมอยู่แล้ว โดยดื้อต่อ cephalosporins, ß-lactams, sulphonamides ในระดับสูงและดื้อต่อ clindamycin, aminoglycosides ในระดับต่ำ (Moellering, 1991; Murray and Mederski-Samaroj, 1983) นอกจากนี้เชื้อยังพัฒนาการดื้อยาโดยการรับ plasmid หรือ transposons จากเชื้ออื่น ทำให้ดื้อต่อ clindamycin, aminoglycosides ได้ในระดับสูง และดื้อต่อ chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, ß-lactams, fluoroquinolones และ glycopeptides ได้ (Landman and Quale, 1997) ต่อมาได้มีการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ *Enterococcus* ด้วยวิธี conjugation โดยใช้ *E. faecium* สเตรนที่มียีน *vanA* เป็นตัวให้ (donor) และใช้ *E. faecium* สเตรนที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะเป็นตัวรับ (recipient) พบว่า *E. faecium* ตัวรับสามารถรับยีน *vanA* ได้ และยังพบอีกว่าเชื้อนั้นถูกโน้มนำให้ดื้อข้ามต่อ streptomycin และ rifampicin ได้อีกด้วย (Lund and Edlund, 2001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการเป็น 4 ระยะ คือ

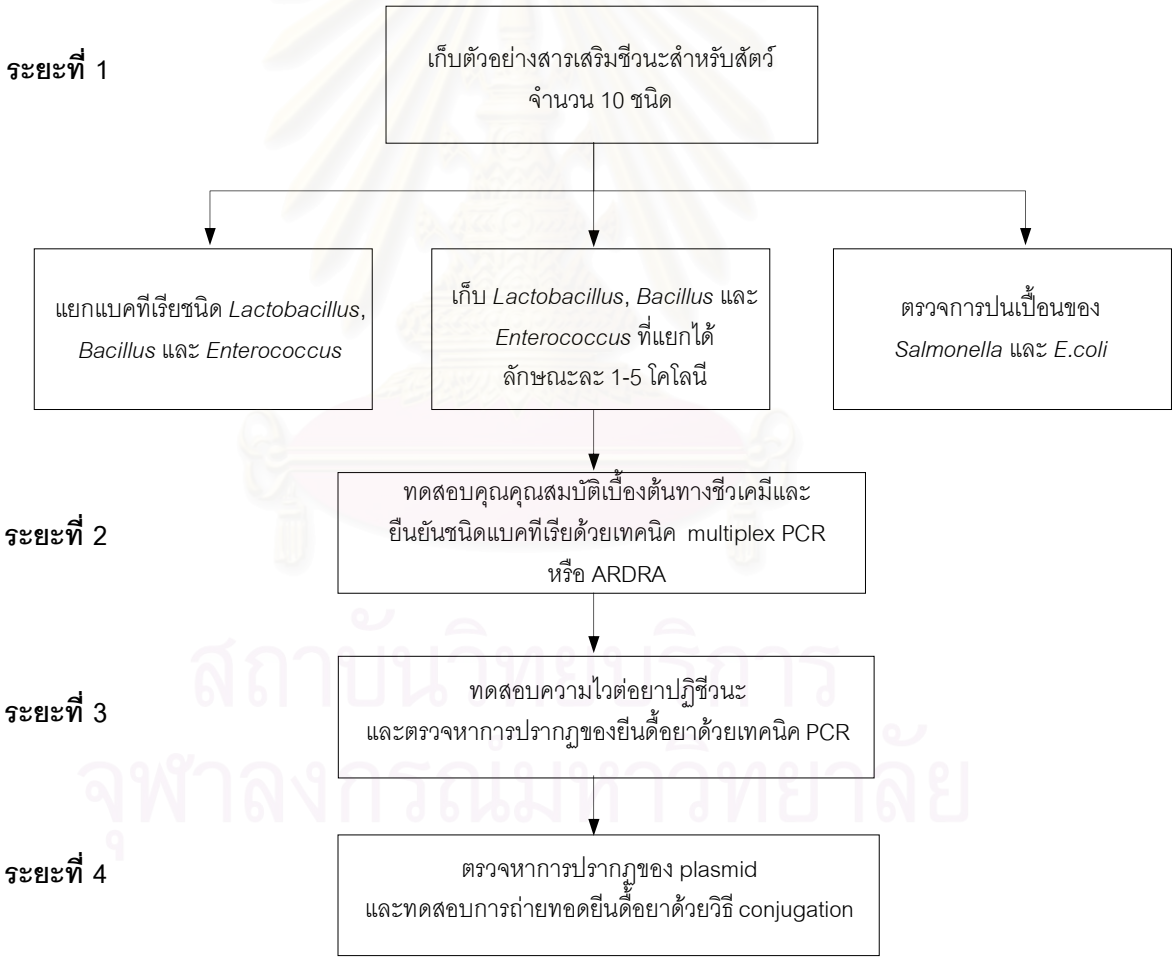
ระยะที่ 1 แยกแบคทีเรียและตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา

ระยะที่ 3 ศึกษารูปแบบและพันธุกรรมการดื้อยา

ระยะที่ 4 ศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา

แผนภูมิวิธีการดำเนินการวิจัยแสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 1 แยกแบคทีเรียและตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค

1.1 การเก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะ

เก็บตัวอย่างสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบ จำนวน 10 ชนิด (ชนิดในที่นี้หมายถึง ชื่อทางการค้า) ชนิดละ 2 ตัวอย่าง โดยการจัดซื้อหรือขอความอนุเคราะห์จากบริษัทผู้ผลิต เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1 และ 2 เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* รวมถึงยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนี้บางผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 2, 3 และ 7 มีแร่ธาตุและเอนไซม์เป็นส่วนประกอบด้วย โดยผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นภายในประเทศ ส่วนผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 2, 3 และ 13 เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าจากต่างประเทศ ผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะชนิดที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 9 เป็นผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสุกร ส่วนผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 4, 8 และ 10 เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสุกรและไก่ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 5 ไม่มีการระบุว่าเป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ชนิดใด ซึ่งในการเก็บตัวอย่างนั้นจะเก็บจากผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่มีการเปิดภาชนะบรรจุ กรณีที่มีความจำเป็นต้องมีการแบ่งเก็บจะใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการแล้วเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการตรวจแยกแบคทีเรียและตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคภายใน 7 วัน รายละเอียดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างตามที่ระบุบนฉลากแสดงในตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 รายละเอียดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะตามที่ระบุบนฉลาก

ผลิตภัณฑ์เสริมชีวนะ	ข้อมูลที่แสดงบนฉลาก	
	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวน (CFU/g หรือ 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. acidoplilus*	$1x10^{10}$
	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	*L. acidoplilus*	$1.67x10^8$
	E. faecium	$1.67x10^8$
8	*B. subtilis*	$1x10^9$
	L. acidoplilus	$1x10^4$
9	*B. subtilis*	$1x10^9$
	B. licheniformis	$1x10^9$
	E. faecium	$1x10^7$
10	*L. casei*	$1x10^9$
	L. plantarum	$1x10^9$
	L. brevis	$1x10^9$
	S. faecium	$1x10^9$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การแยกแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* จากสารเสริมชีวนะ

เนื่องด้วยผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาและแยกแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มเท่านั้น โดยใช้วิธีมาตรฐาน ดังนี้

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างสารเสริมชีวนะ

ก่อนทำการแยกแบคทีเรียเป้าหมาย ต้องเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมต่อการนำไปแยกเชื้อ โดยเตรียมตัวอย่างสารเสริมชีวนะที่ความเข้มข้น 10^{-1} สำหรับสารเสริมชีวนะแบบแห้งจะเตรียมโดยชั่งสารเสริมชีวนะ 20 กรัม ละลายในสารละลาย Peptone Saline Diluting fluid (PSD) ปริมาตร 180 มิลลิลิตร และอบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที สำหรับสารเสริมชีวนะแบบเหลว เตรียมจากสารเสริมชีวนะปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสารละลาย PSD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อใน PSD แบบ 10-fold จนได้ตัวอย่างที่ความเข้มข้นตามที่ต้องการ โดยจะพิจารณาจากข้อมูลที่แสดงบนฉลากผลิตภัณฑ์ เช่น ข้อมูลบนฉลากแสดงว่ามีจำนวนเชื้อที่ 10^{6} ก็จะทำการเจือจางตัวอย่างจนได้เท่ากับ 10^{-6} โดยตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้วจะนำไปแยกเชื้อทั้ง 3 ชนิดทันที

1.2.2 การแยกเชื้อ *Lactobacillus*

แยกเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้วิธี pour plate method ตามวิธีมาตรฐาน Microbiology of food and amimal feeding stuffs-Horizontal method for the Enumeration of mesophilic Lactic acid bacteria (ISO 15214, 1998) โดยไปเปตตัวอย่างที่เจือจางไว้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 จาน (duplicates) แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะชนิด de Mans Rogosa and Sharpe agar (MRS) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างสารเสริมชีวนะ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง

1.2.3 การแยกเชื้อ *Bacillus*

แยกเชื้อ *Bacillus* โดยใช้วิธี spread plating method ตามวิธีมาตรฐาน Microbiology general guidance for enumeration of *Bacillus cereus* (ISO 7932, 1993) โดยไปเปตตัวอย่างที่เจือจางไว้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะชนิด Manitol Egg Yolk Polymyxin-B agar (MYP) จำนวน 2 จาน แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

1.2.4 การแยกเชื้อ *Enterococcus*

แยกเชื้อ *Enterococcus* โดยใช้วิธี pour plate method ตามวิธีมาตรฐาน European Community Project SMT4 CT98-2235 (European commission, 2003) โดยไปเปตตัวอย่างที่เจือจางไว้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 จาน แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะชนิด SF-Streptococcus agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างสารเสริมชีวนะ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง

1.3 การตรวจนับจำนวนและเลือกเก็บแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus*

ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยเลือกจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อขึ้นระหว่าง 30-300 โคโลนี นับจำนวนเชื้อทั้ง 2 จาน แล้วหาจำนวนเชื้อเฉลี่ย สำหรับ *Bacillus* นำจำนวนเชื้อเฉลี่ยคูณด้วยส่วนกลับของการเจือจางและคูณด้วย 10 ส่วน *Lactobacillus* และ *Enterococcus* นำจำนวนเชื้อเฉลี่ยคูณด้วยส่วนกลับของการเจือจาง รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี หน่วยเป็น colony forming units/gram (CFU/g) หรือ colony forming units/mililitters (CFU/ml)

ลักษณะเฉพาะทางโคโลนีของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีดังนี้

1.3.1 ลักษณะของ *Lactobacillus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS จะมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 1 มิลลิเมตร ส่วนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น รูปร่างกลมหรือรี

1.3.2 ลักษณะ *Enterococcus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SF มีขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด เมื่ออบเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง จะมีสีโคโลนีแต่งต่างกัน โดย *E.* faecium มีสีชมพูอ่อน และ *E. faecalis* มีสีแดงเข้ม

1.3.3 ลักษณะของ *Bacillus* แต่ละ species ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MYP มีลักษณะแตกต่างกันดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนี	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)
B. subtilis	สีเหลือง นูน เป็นเมือกเล็กน้อย	2 - 4
B. cereus	สีแดง แบนราบ ขอบไม่เรียบ	3 – 6
B. licheniformis	สีเหลืองหรือขาวใส เป็นเมือกหนา	3 – 5
B. mycoides	สีเหลืองหรือชมพูอ่อน แบนราบ ขอบไม่เรียบ	3 – 6
B. laterosporus	สีเหลืองหรือขาว นูน ขอบเรียบ	1 -3

สำหรับการเลือกเก็บโคโลนีนั้น เนื่องจากเชื้อแต่ละโคโลนีอาจมีลักษณะแตกต่างไปบ้างตามสายพันธุ์ จึงเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกัน ลักษณะละ 1-5 โคโลนี โดย *Bacillus* และ *Enterococcus* จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB ชนิดเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ส่วน *Lactobacillus* จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS ชนิดเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อปริมาตร 1,480 ไมโครลิตร ใน glycerol ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ที่ -80 °C เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อเบื้องต้นด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีที่อธิบายในระยะที่ 2 และ 3 ต่อไป

1.4 การตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* และ *E.coli*

ทำการตรวจหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* ด้วยวิธีมาตรฐานของ Modified Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella* (ISO 6579, 1993) โดยเตรียมตัวอย่างสารเสริมชีวนะ 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ในสารละลาย Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18$\pm$2 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* จากนั้นจึงแยกเชื้อด้วยวิธี direct plating method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD) อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง (ISO 6579, 1993) โดยลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD จะมีลักษณะกลม ขนาดปานกลาง โคโลนีใสและมีสีดำตรงกลาง (รูปที่ 5)

ส่วนการตรวจหาการปนเปื้อนของ *E. coli* นั้น ใช้วิธีมาตรฐานของ Microbiology general guidance for enumeration of presumptive *Escherichia coli* most probable number technique (ISO 7251, 1993) โดยเตรียมตัวอย่างสารเสริมชีวนะ 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ในสารละลาย PSD ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosine Methylene Blue agar (EMB) อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง (ISO 7251, 1993) โดย *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB จะมีลักษณะโคโลนีสีเข้มตรงกลางค่อนข้างดำ ลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 โคโลนีของ *Salmonella* และ *E.coli* (ซ้าย) *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ (ขวา) *E.coli* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB

ถ้าพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* หรือ *E.coli* จะทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* และ *E.coli* ใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ตรวจหาการปรากฏของplasmidและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาตามวิธีที่อธิบายในระยะที่ 3 และ 4 ต่อไป

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา

2.1 การตรวจคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

ตรวจดูลักษณะของ *Bacillus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* ด้วยการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain ซึ่งเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ย้อมติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อน ส่วน *Enterococcus* นั้น ย้อมติดสีม่วง รูปร่างกลม

2.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ทดสอบเบื้องต้นด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ตามวิธีที่อธิบายใน Cowan and Steel's manual for the identification of

medical bacteria (Barrow and Feltham, 1993) โดยรายละเอียดของสารที่ใช้ในการทดสอบในขั้นตอนนี้ แสดงไว้ในภาคผนวก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแต่ละกลุ่ม ดังนี้

2.2.1 *Lactobacillus*

นำเชื้อ *Lactobacillus* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จำนวน 120 โคโลนี ที่เลือกเก็บไว้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อระบุว่าเป็น genus ของ *Lactobacillus* โดยทำการทดสอบ catalase test, Voges Proskauer (VP) test และ nitrate reduction test โดยเชื้อ *Lactobacillus* จะให้ผลลบต่อการทดสอบทั้ง 3 วิธี ดังนี้

- Catalase test ทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของ *Lactobacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย 3%hydrogenperoxide (H_2O_2) ลงบนเชื้อ *Lactobacillus* ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่ามีผลบวก แต่หากไม่ฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

- VP test ทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของ *Lactobacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในสารละลาย VP อบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลการทดสอบโดยหยดสารละลาย 40% Potassium hydroxide (KOH) และสารละลาย alpha-anaptol จำนวน 4-5 หยด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย VP โดยถ้าเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสีแดง แสดงว่าให้ผลบวก แต่หากสารละลายไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

- Nitrate reduction test ทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของ *Lactobacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในสารละลาย nitrate อบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลการทดสอบ โดยหยดสารละลาย A และ B จำนวน 4-5 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย nitrate โดยถ้าเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสีแดง แสดงว่าให้ผลบวก แต่หากสารละลายไม่เปลี่ยนสีให้เติมผง zinc ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าให้ผลบวกเช่นกัน แต่หากสารละลายยังคงไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

นำเชื้อที่ให้ผลลบต่อการทดสอบทั้ง 3 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย Genus *Lactobacillus* มาทดสอบต่อเพื่อระบุ species ของ *Lactobacillus* โดยทดสอบการย่อยน้ำตาล จำนวน 6 ชนิด คือ arabinose, galactose, lactose, maltose, mannitol, raffinose และ sorbital ทำการทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของ *Lactobacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลงใน ammonium salt sugar (ASS) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1% อบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล

การทดสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ ASS โดยถ้าเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก แต่หายังมีสีม่วงเช่นเดิม แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus* แต่ละ species ให้ผลการทดสอบ ดังนี้

แบคทีเรีย	การย่อยน้ำตาล							
	Arabinose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Raffinose	Sorbitol	Nitrate reduction
L. acidophilus	-	+	+	+	-	d	-	-
L. jenenii	-	+	-	d	d	-	-	-
L. delbrueckii	-	d	d	d	-	-	-	-
L. salivarius	-	+	+	+	+	+	+	-
L. gasseri	-	-	d	d	-	d	-	-
L. casei	-	-	d	-	-	-	-	+
L. plantarum	d	+	+	+	+	+	+	-
L. brevis	+	d	d	+	-	d	-	-
L. fermentum	d	-	-	-	-	-	-	-

\+ หมายถึง 85-100% ของสายพันธุ์ให้ผลบวก

\- หมายถึง 0-15% ของสายพันธุ์ให้ผลบวก

d หมายถึง 16-84% ของสายพันธุ์ให้ผลบวก

2.2.2 *Bacillus*

นำเชื้อ *Bacillus* ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP จำนวน 145 isolates ที่เลือกเก็บไว้มาทำการทดสอบ catalase test, oxidase test, VP test, nitrate reduction test, urease test และการย่อยน้ำตาลจำนวน 4 ชนิด คือ galactose, mannose, raffinose และ xylose โดยมีวิธีการทดสอบ catalase test, VP test และ nitrate reduction test เช่นเดียวกับ *Lactobacillus* ส่วนการทดสอบ oxidase test, urease test และการทดสอบการย่อยน้ำตาลนั้นมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

- Oxidase test ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย oxidase reagent ลงบน filter paper เขี่ยโคโลนีของ *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ลงบน filter paper สังเกตการเปลี่ยนสี

ของเชื้อ โดยถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วง แสดงว่าให้ผลบวก แต่หากเชื้อไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

- Urease test ทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของ *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ลงในสารทดสอบ อบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของสารทดสอบ โดยถ้าเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู แสดงว่าให้ผลบวก แต่หากสารทดสอบยังคงมีสีเหลือง แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ

- ทดสอบการย่อยน้ำตาล จำนวน 4 ชนิด ดังกล่าว โดยเขี่ยโคโลนีของ *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ลงใน broth sugar (BS) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1% อบเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ BS โดยถ้าเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก แต่หายังมีสีเขียวเช่นเดิม แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* แต่ละ species ให้ผลการทดสอบ ดังนี้

แบคทีเรีย	การย่อยน้ำตาล							
	Galactose	Mannose	Raffinose	Xylose	Urease	VP	Nitrate reduction	Oxidase
B. anthracis	-	-	-	-	-	+	+	d
B. cereus	-	-	-	-	d	+	+	d
B. mycoides	d	-	-	-	d	+	+	d
B. thuringiensis	-	d	-	-	-	+	+	d
B. firmus	-	d	-	d	-	-	+	-
B. lentus	d	+	-	-	+	-	-	+
B. megaterium	+	d	d	+	d	-	d	-
B. pumilus	+	+	+	+	-	+	-	-
B. subtilis	d	+	+	d	-	+	+	-
B. licheniformis	+	+	d	+	d	d	+	-
B. amyloliquefaciens	d	d	+	d	-	+	+	-

คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของ *Lactobacillus*, *Bacillus* โดยละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 1 และ 2

2.2.3 *Enterococcus*

นำเชื้อ *Enterococcus* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ SF จำนวน 7 isolates ที่เลือกเก็บไว้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพียง 2 อย่าง คือ Oxidase test และ Catalase test ซึ่งเชื้อ *Enterococcus* จะให้ผลบวกต่อการทดสอบทั้ง 2 อย่าง

จากการที่แต่ละ species ของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* มีคุณสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกันมาก ทำให้วิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นนั้นไม่สามารถระบุชนิดแบคทีเรียดังกล่าวด้วยได้อย่างแม่นยำ จำเป็นต้องยืนยันชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาต่อไป

2.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยัน *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อทั้ง 3 ชนิดเป็นวิธีที่มีพื้นฐานมาจาก Polymerase Chain Reaction โดยในการทำ PCR ทั้งหมดใช้ DNA ที่เตรียมด้วยวิธี whole cell boiled lysate (Kwon et al., 2004) และใช้ 2.5 x Eppendorf MasterMix (Eppendrof®, Hamburg, Germany) ตามคำแนะนำของทางบริษัท โดยทำปฏิกิริยา เพิ่มจำนวน DNA บนเครื่อง Thermocycler (Thermoelectron corporation®, USA) ซึ่งรายละเอียดของ primers ทั้งหมดที่ใช้ในขั้นตอนนี้แสดงในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์ยืนยัน *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus*

Primers	ลำดับเบส (5'-3')	ชนิด PCR	ขนาดของ PCR Product (bp)	ที่มา
Bacillus				
B-K1/F	TCACCAAGGCRACATGCG	All Bacillus	~1,114	Wu et al., 2006
B-K1/R	CGTATTCACCGCGGCATG			Wu et al., 2006
Lactobacillus				
R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTTCA	Genus-specificity	Variable	Nakagawa et al., 1994
LbLMA1-rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC			Dubernet et al., 2002
IDL03R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA	All *Lactobacillus*		Kwon et al., 2004
IDL04F	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	All *Lactobacillus*		Kwon et al., 2004
IDL11F	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG	*L. casei* group	727	Kwon et al., 2004
IDL22R	AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC	*L. acidoplilus*	606	Kwon et al., 2004
IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	*L. delbrueckii*	84	Kwon et al., 2004
IDL42R	ATTTCAAGTTGAGTCTCTCTCTC	*L. gasseri*	272	Kwon et al., 2004
IDL52F	ACCTGATTGACGATGGATCACCAGT	*L .reuteri*	1,105	Kwon et al., 2004
IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAAACTGC	*L. plantarum*	428	Kwon et al., 2004
IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTGCTTGC	*L. rhamnosus*	448	Kwon et al., 2004
Enterococcus				
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	Genus-specificity	112	Ke et al., 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	*E. faecalis*	360	Jackson et al., 2004
FL2	TAATGGTGAAATCTTGGTTTGG			
FM1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	*E. faecium*	215	Jackson et al., 2004
FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA			
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	*E. gallinarum*	173	Jackson et al., 2004
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	*E. casseliflavus*	288	Jackson et al., 2004
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG			
HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	*E. hirae*	187	Jackson et al., 2004
HI2	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG			
DU1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	*E. durans*	295	Jackson et al., 2004
DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG			

2.3.1การเตรียม DNA ด้วยวิธี whole cell boiled lysate

สำหรับเชื้อ *Bacillus* และ *Enterococcus* เตรียมเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* และ *Enterococcus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar และ SF agar ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีจำนวน 1 โคโลนี ลงใน eppendrof tube ที่มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 ºC นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ดูดเก็บของเหลวใส เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ต่อไป

สำหรับ *Lactobacillus* ใช้เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24-48 ชั่วโมง โดยนำเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน eppendrof tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตรโดยนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 1 นาที ไปเปตของเหลวออกจนเหลือปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 ºC นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ดูดเก็บของเหลวใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ต่อไป

2.3.2การตรวจยืนยัน *Bacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

นำเชื้อที่ยืนยันได้ว่าเป็น *Bacillus* spp. จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจำนวน 114 โคโลนี มาทำการยืนยัน genus และ species ของ *Bacillus* ด้วยเทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ตามวิธีที่อธิบายโดย Wu และคณะในปี 2006 ตามขั้นตอนดังนี้

1) ระบุ genus ด้วยการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วย B-K1F และ B-K1R primers (ตารางที่ 3) โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ดังนี้

	ปริมาตร		ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	5	µl	100-300 µM
10 µM ของ primers แต่ละตัว	1	µl	0.5 µM
2.5 x Eppendorf MasterMix	12.5	µl	1x
Nuclease free water	5.5	µl	
ปริมาตรรวม	25	µl	

จากนั้นนำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ในเครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	94 ºC	4 นาที
2.	Denaturation	94 ºC	30 วินาที
	Annealing	63 ºC	30 วินาที
	Extension	72 ºC	2 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 25 รอบ		
3.	Final extension	72 ºC	10 นาที
	Holding tempurature	25 ºC	

ตรวจสอบขนาด PCR products บน 2% agarose gel ด้วย gel electrophoresis (OWL Scientific Inc.®, USA) และตรวจดูการปรากฏของ DNA เป้าหมายด้วยเครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat®) โดย *Bacillus* จะให้ PCR products ขนาด 1,140 bp

2) ยืนยัน species ของ *Bacillus* โดยการตัด PCR products ด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *TaqI* (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) ซึ่ง *Bacillus* แต่ละ species จะให้รูปแบบของ DNA หลังจากถูกตัดด้วย *AluI* และ *TaqI* ที่แตกต่างกันและสามารถใช้ในการระบุ species ของ *Bacillus* ได้ โดยทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

ปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

	ปริมาตร	
PCR products	10	µl
AluI	1	µl
10× buffer Tango	2	µl
Nuclease free water	7	µl
ปริมาตรรวม	20	µl

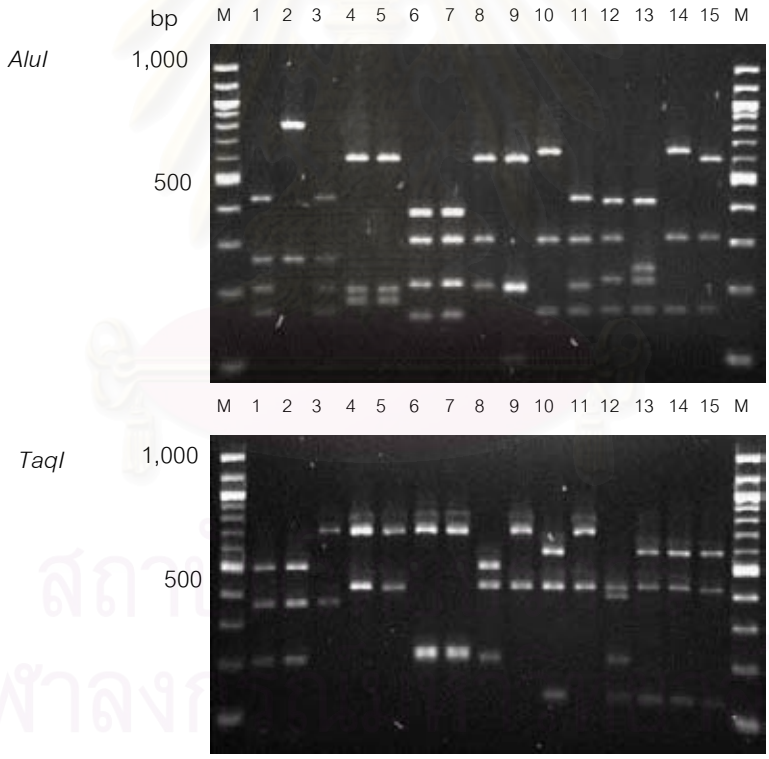
Incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{O} C นาน 6 ชั่วโมง

ปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

	ปริมาตร	
PCR products	10	µl
TaqI	1	µl
10× buffer *Taq* I	2	µl
Nuclease free water	7	µl
ปริมาตรรวม	20	µl

Incubate ที่อุณหภูมิ 56^{O} C นาน 6 ชั่วโมง

จากนั้นตรวจสอบรูปแบบ ARDRA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *TaqI* บน 2% agarose gel ด้วย gel electrophoresis และตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยรูปแบบ ARDRA ของ *Bacillus* แสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 รูปแบบ ARDRA ของ *Bacillus* spp. PCR products ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I (บน) และ *TaqI* (ล่าง) M, DNA ladder: 1, *B. subtilis*; 2, *B.licheniformis*; 3, *B. pumilus*; 4, *B. cereus*; 5, *B. thuringiensis*; 6, *B. laterosporus*; 7, *B. laterosporus*; 8, *B. coagulans*; 9, *B. sphaericus*; 10, *B. circulans*; 11, *B. badius*; 12, *B. clausii*; 13, *P. polymyxa* ; 14, *P. larvae*; 15, *P. lentimorbus* (ที่มา: ดัดแปลงจาก Wu et al., 2006)

2.3.2 *Lactobacillus*

นำเชื้อที่ยืนยันได้ว่าเป็น *Lactobacillus* spp. จำนวน 97 โคโลนี ยืนยัน genus และ species ของ *Lactobacillus* ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ genus คือ R16-1 และ LbLMA1-rev primers และตรวจพิสูจน์ species จำนวน 7 species คือ *L. casei* group, *L. acidoplilus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. reuteri* , *L. plantarum*, *L. rhamnosus* ด้วย primers ที่มีความจำเพาะ โดยใช้ IDL03R primer กับ reverse primer และใช้ IDL04R primer กับ forward primer โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 50 µl ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	5 µl	
10 µM ของ primers	1 µl	0.25 µM
2.5 x Eppendorf MasterMix	25 µl	1x
Nuclease free water	10 µl	
ปริมาตรรวม	50 µl	

จากนั้นนำส่วนผสมใส่เครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	94 ºC	4 นาที
2.	Denaturation	94 ºC	30 วินาที
	Annealing	63 ºC	30 วินาที
	Extension	72 ºC	2 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 25 รอบ		
3.	Final extension	72 ºC	10 นาที
	Holding tempurature	25 ºC	

ทำการตรวจสอบขนาด PCR products บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis และตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator โดย *Lactobacillus* จะให้ขนาด PCR products ที่มีขนาดต่างกัน จึงยืนยันความจำเพาะของ primers ด้วยการตรวจหาลำดับเบส

ส่งตัวแทนตัวอย่าง DNA ไปตรวจหาลำดับเบสเพื่อยืนยันความจำเพาะของ primers โดยหลังจากตรวจสอบขนาดของ PCR products ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product ทำการสกัด DNA ออกจากแผ่น gel โดยใช้ชุด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendrof, Hamburg, Germany) ตามวิธีที่แนะนำโดย

บริษัทผู้ผลิต โดยส่งตัวอย่าง DNA ไปตรวจหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen Inc. กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้

2.3.3 *Enterococcus*

นำเชื้อที่ยืนยันได้ว่าเป็น *Enterococcus* spp. จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจำนวน 7 โคโลนี ยืนยัน genus และspecies ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ genus คือ Ent1 และ Ent2 primers และตรวจพิสูจน์ species จำนวน 6 species คือ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* และ *E. durans* ด้วย primers ที่มีความจำเพาะต่อสปีส์ต่างๆ โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	5 µl	
10 µM ของ primers	1 µl	0.5 µM
2.5 x Eppendorf MasterMix	12.5 µl	1x
Nuclease free water	1.5 µl	
ปริมาตรรวม	25 µl	

จากนั้นนำส่วนผสมใส่เครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	94 ºC	4 นาที
2.	Denaturation	94 ºC	30 วินาที
	Annealing	63 ºC	30 วินาที
	Extension	72 ºC	2 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 25 รอบ		
3.	Final extension	72 ºC	10 นาที
	Holding tempurature	25 ºC	

ทำการตรวจสอบขนาด PCR products บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis และตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator เนื่องจากเชื้อ *Enterococcus* ที่ทำการทดสอบในขั้นนี้มีเพียง 7 โคโลนี และทุกโคโลนีให้ PCR products ที่มีขนาดเท่ากัน ดังนั้นจึงส่ง DNA จำนวน 1 โคโลนี ไปทำการตรวจหาลำดับเบส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 3 ศึกษารูปแบบและพันธุกรรมการดื้อยา

3.1 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อทั้งหมดจำนวน 211 isolates ซึ่งเป็นเชื้อ *Bacillus* จำนวน 114 isolates และเป็น *Lactobacillus* จำนวน 97 isolates มาทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Two-fold agar dilution สำหรับเชื้อ *Enterococcus* ไม่สามารถทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้จำนวน 7 isolates นั้นไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีก โดย *Bacillus* ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Intitute (CLSI) 1999 ส่วน *Lactobacillus* นั้นทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LAB susceptibility test medium ที่ประกอบด้วย Iso-Sensitest broth และ deMan-Rogosa-Sharpe broth ในอัตราส่วน 9:1 ตามวิธีที่อธิบายใน Klare และคณะ (2005) โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด ดังตารางที่ 4 และใช้ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เป็นตัวควบคุมการทดสอบ

การทำ MIC แบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ต้องการทดสอบ (ตารางที่ 4) โดยเริ่มเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA หรือ LAB susceptibility test medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เตรียมยาปฏิชีวนะตั้งต้นตามวิธีที่แสดงในภาคผนวกที่ 3 จากนั้นเตรียมยาปฏิชีวนะในระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการทดสอบใน 0.85%normal saline solution (0.85% NSS) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold ใน 0.85% NSS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จนได้ยาปฏิชีวนะทุกความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เติมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนผสมดังกล่าวบนจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนแข็งก่อนนำไปใช้

2) การเตรียมตัวอย่างเชื้อและการทำ MIC

โตเชื้อ *Lactobacillus* หรือ *Bacillus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MHA ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนี *Lactobacillus* หรือ *Bacillus* ลงใน 0.85% NSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่ 0.5 Mcfarland จากนั้นไปเปตเชื้อมา 1 มิลลิลิตร เจือจางใน 0.85% NSS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ไปเปตมา 100 ไมโครลิตร ใส่ใน microtiter plate ขนาด 96 หลุม ใช้ Replica plater วางลงบนเชื้อใน microtiter plate ก่อนวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผสมยาปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้จนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

3) การอ่านผล

อ่านผลหลังจากอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีออกซิเจนนาน 20-24 ชั่วโมง โดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเมื่อมองด้วยตาเปล่าถือเป็นค่า MIC ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ค่าความเข้มข้นของยาที่บ่งชี้ว่าเชื้อดื้อหรือไวต่อยา (breakpoint) ที่กำหนดโดย SCAN ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (µg/ml)	ค่า breakpoint	
		Bacillus	*Lactobacillus*
1. ampicillin	1, 2, 3, 4, 8, 16	2	2
2. chloramphenicol	1, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64, 128	16	16
3. ciprofloxacin	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16	1	4
4. erythromycin	1, 2, 4, 8, 16, 32	4	4
5. gentamycin	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	8	1
6. kanamycin	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	64	32
7. neomycin	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	64	32
8. rifampicin	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	4	32
9. streptomycin	1, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64, 128	64	16
10. tetracycline	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	16	16
11. trimethoprim	1, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	8	32
12. vancomycin	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	4	4

3.2 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เน้นศึกษาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อ tetracycline, vancomycin, erythromycin และ streptomycin โดยตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าว ในเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิดนั้นๆ รวมถึงเชื้อที่มีการปรากฏของ plasmid ด้วย เหตุที่ไม่ทำการตรวจในเชื้อ *Enterococcus* เนื่องจากเชื้อ Enterococcus ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีก และเมื่อทำการแยกเชื้ออีกครั้งก็ยังประสบปัญหาเช่นเดิม

การศึกษาตลอดขั้นตอนนี้ใช้เทคนิค PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งการทำ PCR ทั้งหมดใช้ 2.5 x Eppendorf MasterMix ตามคำแนะนำของทางบริษัท และใช้ DNA ที่เตรียมด้วยวิธี whole cell boiled lysate เพิ่มจำนวน DNA บนเครื่อง Thermocycler

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 primers ที่ใช้ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยา

ชนิดยีน	Primers	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ PCR Product (bp)	ที่มา
aadE	aadEI	GCAGAACAGGATGAACGTATTCG	369	Klare et al., 2007
	aadEII	ATCAGTCGGAACTATGTCCC		
tetK	tetKI	CAATACCTACGATATCTA	352	Klare et al., 2007
	tetKII	TTGAGCTGTCTTGGTTCA		
tetL	tetLI	TGGTCCTATCTTCTACTCATTC	385	Werner et al., 2003
	tetLII	TTCCGATTTCGGCAGTAC		
tetM	tetMI	GGTGAACATCATAGACACGC	401	Werner et al., 2003
	etMII	CTTGTTCGAGTTCCAATGC		
tetO	tetOI	AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC	1,723	Klare et al., 2007
	tetOII	CGGCGGGGTTGGCAAATA		
tetS	tetSI	ATCAAGATATTAAGGAC	573	Gervers et al., 2003
	tetSII	TTCTCTATGTGGTAATC		
tetW	tetWI	GGMCAYRTGGATTTYWTIGC	1,187	Aminov et al., 2001
	tetWII	TCIGMIGGIGTRCTIRCIGGRC		
vanA	vanA1	GGGAAAACGACAATTGC	-	Dutka-Malen et al., 1995
	vanA2	GTACAATGCGGCCGTTA		
vanB	vanB1	ATGGGAAGCCGATAGTC	-	Dutka-Malen et al., 1995
	vanB2	GATTTCGTTCCTCGACC		
vanC	vanC1	GGTATCAAGGAAACCTC	-	Dutka-Malen et al., 1995
	vanC2	CTTCCGCCATCATAGCT		
ermA	ermAI	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	645	Sutclifee et al., 1995
	ermAII	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT		
ermB	ermBI	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	639	Sutclifee et al., 1995
	ermBII	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAG		
ermC	ermCI	TCAAAACATAATATAGATAAA	643	Sutclifee et al., 1995
	ermCII	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยา tetracycline

ทำการตรวจหาการปรากฏของยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* และ *tetW* ในเชื้อ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ชนิดละ 20 isolates โดยเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 3 isolates และไม่มี plasmid จำนวน 17 isolates ส่วน *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 15 isolates และไม่มี plasmid จำนวน 5 isolates ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะ โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	5 µl	
10 µM ของ primers	1 µl	0.5 µM
2.5 x Eppendorf MasterMix	12.5 µl	1x
Nuclease free water	1.5 µl	
ปริมาตรรวม	25 µl	

จากนั้นนำส่วนผสมใส่เครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-conditions ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	95 ºC	5 นาที
2.	Denaturation	94 ºC	45 วินาที
	Annealing	52 ºC	45 วินาที
	Extension	72 ºC	45 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 30 รอบ		
3.	Final extension	72 ºC	7 นาที
	Holding tempurature	25 ºC	

ตรวจสอบขนาด PCR product บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis ตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetL* และ *tetW* มีขนาด PCR product ขนาด 352 bp, 385 bp, 401 bp, 1,723 bp, 573 bp และ 1,187 bp ตามลำดับ

โดยใช้เชื้อ *Campylobacter coli* CAC041 ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการและมีการปรากฏของยีน *tetO* เป็น positive control เชื้อ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบยีน *tetW* จากการศึกษาครั้งนี้ที่ยืนยันยีน *tetW* ด้วยการส่งตรวจหาลำดับเบสแล้วเป็น positive control และเชื้อ *E. coli* จากการศึกษาของ Bryan และคณะ (2004) เป็น positive control ในการตรวจหายีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, และ *tetS*

3.2.2 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยา streptomycin

ทำการตรวจหาการปรากฏของยีน *aadE* ในเชื้อ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่ดื้อต่อ streptomycin ชนิดละ 10 isolates โดยเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 3 isolates และไม่มี plasmid จำนวน 7 isolates ส่วน *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 5 isolates และไม่มี plasmid จำนวน 5 isolates ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl เช่นเดียวกับการตรวจหายีน *tet* ภายใต้ PCR-conditions ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	95 °C	5 นาที
2.	Denaturation	94 °C	45 วินาที
	Annealing	58 °C	45 วินาที
	Extension	72 °C	45 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 30 รอบ		
3.	Final extension	72 °C	7 นาที
	Holding tempurature	25 °C	

ตรวจสอบขนาด PCR products บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis ตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยยีน *aadE* ให้ PCR products ขนาด 369 bp

โดยใช้เชื้อ *C. coli* CAC094 ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการเป็น positive control ของยีน *aadE*

3.2.3 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยา vancomycin

ทำการตรวจหาการปรากฏของยีน *vanA*, *vanB* และ *vanC* โดยตรวจในเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ชนิดละ 10 isolates ที่ดื้อต่อยา vancomycin ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 3 isolates และไม่มี plasmid จำนวน 7 isolates ส่วน *Lactobacillus* ทั้งหมดที่ใช้เป็นเชื้อที่มี plasmid ตรวจหาด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะ โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ภายใต้ PCR-conditions ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	95 ºC	5 นาที
2.	Denaturation	94 ºC	45 วินาที
	Annealing	53 ºC	45 วินาที
	Extension	72 ºC	45 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 30 รอบ		
3.	Final extension	72 ºC	7 นาที
	Holding tempurature	25 ºC	

ตรวจสอบขนาด PCR product บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis ตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบยีน *vanA* จากการศึกษาครั้งนี้ที่ยืนยันยีน vanA ด้วยการส่งตรวจหาลำดับเบสแล้วเป็น positive control

3.2.4 ตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่ควบคุมการดื้อต่อยา erythromycin

ทำการตรวจหาการปรากฏของยีน *ermA*, *ermB* และ *ermC* ในเชื้อ *Bacillus* ที่ดื้อต่อยา erythromycin จำนวน 10 isolates เป็นเชื้อที่มี plasmid จำนวน 3 isolates และเป็นเชื้อที่ไม่มี plasmid อีก 7 isolates โดยไม่ทำการตรวจในเชื้อ *Lactobacillus* เนื่องจากไม่ตรวจพบเชื้อ *Lactobacillus* ที่ดื้อต่อยา erythromycin ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ดังนี้ ภายใต้ PCR-conditions ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	95 °C	5 นาที
2.	Denaturation	94 °C	45 วินาที
	Annealing	48 °C	45 วินาที
	Extension	72 °C	45 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 30 รอบ		
3.	Final extension	72 °C	7 นาที
	Holding tempurature	25 °C	

ตรวจสอบขนาด PCR product บน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis ตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยยีน *ermA*, *ermB* และ *ermC* มีขนาด PCR products เท่ากับ 645 bp, 639 bp และ 643 bp ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 4 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

4.1 ตรวจหาการปรากฏของ plasmid

ตรวจหาการปรากฏของ plasmid ของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ทั้งหมดที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ ด้วยวิธีการสกัด plasmid ดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) broth และ *Lactobacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นปั่นแยกเซลล์จากเชื้อ 3 มิลลิลิตร ใน microcentrifuge tube ที่ความเร็ว 15,000 x g นาน 2 นาที ล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 มิลลิลิตร ละลาย pellets ใน ice cold lysozyme (10 mg/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 N NaOH, 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมาและตั้งบนน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม ice cold potassium acetate pH 4.8 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมด้วยการ vortex ตั้งบนน้ำแข็งนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่ 4ºC นาน 5 นาที ไปเปตของเหลวส่วนใส ใส่ microcentrifuge tube ใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่ 4ºC นาน 5 นาที อีกครั้งและไปเปตของเหลวส่วนใสใส่ microcentrifuge tube ใหม่ ในขั้นนี้จะได้ของเหลวส่วนใส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNaseA (10 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 µg/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 30 นาที จากนั้นเติมส่วนผสม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ประมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมด้วยการ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 2 นาที ไปเปตของเหลวส่วนใส ใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม ice cold absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา และ incubate ที่อุณหภูมิ -70ºC นาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ -20ºC นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่ 4ºC นาน 5 นาที ไปเปตของเหลวส่วนใสทิ้ง ในขั้นตอนนี้ DNA จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ล้าง DNA pellets ด้วย ice cold 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 5 นาที ไปเปตของเหลวส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ DNA pellets แห้งที่อุณภูมิห้องนาน 1 นาที และละลาย DNA pellets ในน้ำกลั่นหรือ TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH 8) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่าง DNA ที่อุณหภูมิ -20ºC จากนั้นนำไปตรวจสอบการปรากฏของplasmid บน 0.8% agarose gel ด้วย gel electrophoresis ตรวจดูการปรากฏของ plasmid DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator

4.2 ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

ทำการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อที่มี plasmid และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี filter mating หรือ conjugation (Mater et al., 2008) โดยเชื้อ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่มี plasmidและดื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นตัวให้ (donors) ส่วนเชื้อ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่ไม่มี plasmidและไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นตัวรับ (recipients)

4.2.1 การเตรียมแบคทีเรียตัวรับ

แบคทีเรียตัวรับของ *Lactobacillus* คือ *L. plantarum* L11.1(2) และ *L. plantarum* L11.5(2) ส่วนแบคทีเรียตัวรับของ *Bacillus* คือ *B. subtilis* B1.6 และ *B. licheniformis* B10.2 เนื่องจากแบคทีเรียตัวรับทั้ง 4 strains ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทำการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นเพื่อให้สามารถแยกได้จากแบคทีเรียตัวให้ จึงต้องทำให้เชื้อ *Bacillus* ตัวรับนั้นดื้อต่อยา tetracycline แบบ spontaneous mutations โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 4 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นไปเปตมา 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่มี tetracycline ที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128 µg/ml อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุม คือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา tetracycline จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tetracycline 64 และ 128 µg/ml นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี tetracycline และ streak ต่อเนื่องนาน 10 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tetracycline ที่ความเข้มข้น 64 หรือ 128 µg/ml อีกครั้ง จากนั้นหาค่า MIC ต่อยา tetracycline โดยใช้เชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี tetracycline เป็นตัวควบคุมการทดสอบ จะได้เชื้อ *Bacillus* mutants คือ B(1.6) tet^r และ B(10.2) tet^r สำหรับ *Lactobacillus* จะทำให้แบคทีเรียตัวรับนั้นดื้อต่อยา rifampicin แบบ spontaneous mutations mutants ด้วยวิธีเดียวกับ *Baciilus* โดยใช้ rifampicin ที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128 µg/ml จะได้เชื้อ *Lactobacillus* mutants คือ L11.1(2)rif^r และ L11.5 rif^r ทำการหาค่า MIC ต่อยา tetracycline, rifampicin และยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

4.2.2 การทำ filter mating

ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ *Bacillus* โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตัวให้และตัวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วย LB ชนิดเหลวในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-7 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อตัวให้และตัวรับเจริญถึงระยะ mid-log phase จากนั้นผสมเชื้อตัวให้และตัวรับอย่างละ 750 ไมโครลิตร ใน microcentrifuge tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 80000 x g นาน 1

นาที ไปเปตของเหลวส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย LB ชนิดเหลวที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 ºC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ไปเปตลงบนแผ่น nitrocellulose filter ที่ pore size 0.45 ไมครอนและเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น filter ที่มีส่วนผสมของเชื้อ ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มี 0.85% NSS อยู่ 1 มิลลิลิตร vortex เพื่อให้ได้ส่วนผสมของเชื้อ นำแผ่น filter ออกและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 1 นาที จากนั้น plate เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่มี rifampicin 50 µg/ml ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่มีความเหมาะสม ได้แก่ tetracycline 10 µg/ml, erythromycin 20 µg/ml และ vancomycin 32 µg/ml คัดเลือกโคโลนีที่ดื้อต่อ tetracycline และยาปฏิชีวนะที่เกี่ยวข้อง ทำการสกัด plasmid จาก transconjugants และตรวจสอบการปรากฏของ plasmid บน 0.8% agarose gel สำหรับ *Lactobacillus* นั้น ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยวิธีเดียวกัน โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตัวให้และตัวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วย MRS ชนิดเหลวในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-7 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อตัวให้และตัวรับเจริญถึงระยะ mid-log phase แล้วทำการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอด plasmid ด้วยวิธี filter mating เช่นเดียวกับเชื้อ *Bacillus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

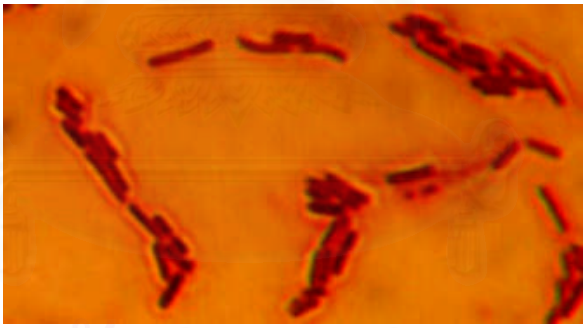
บทที่ 4
ผลการศึกษาวิจัย

1. การแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อจากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์

จากการแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะจำนวน 10 ชนิด เลือกเก็บเชื้อจากลักษณะที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด 272 โคโลนี โดยเป็นเชื้อที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จำนวน 120 โคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อ MYP จำนวน 145 โคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อ SF จำนวน 7 โคโลนี หลังจากทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและอณูชีววิทยาได้เชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 218 isolates ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus* จำนวน 114 isolates เชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 97 isolates และเชื้อ *Enterococcus* จำนวน 7 isolates ผลจากการแยกเชื้อแต่ละชนิดโดยละเอียด มีดังนี้

1.1 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Bacillus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* เมื่อย้อมด้วยวิธี Gram stain และตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อ *Bacillus* มีลักษณะเป็นท่อน ติดสีม่วง ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 เชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ
และย้อมด้วย Gram stain

จากการตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* จำนวน 114 isolates ตรวจพบ *Bacillus* จำนวน 7 species ได้แก่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. lentus* และจากการยืนยันด้วยวิธี ARDRA พบเชื้อ *Bacillus* จำนวน 4 species คือ B. subtilis, *B. licheniformis*, *B. cereus* และ *B. subtilis* cluster (*B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus*) ดังตารางที่ 6 โดยเชื้อมี

รูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งผลการตรวจจำแนกด้วย 2 วิธีดังกล่าว มีบางส่วนที่ผลการทดสอบไม่สอดคล้องกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. subtilis* จากการตรวจทางชีวเคมี เมื่อตรวจพิสูจน์ด้วยวิธี ARDRA พบว่าส่วนหนึ่งให้ผลเป็น *B. subtilis* cluster รายละเอียดความแตกต่างจากการตรวจสอบด้วยวิธีชีวเคมีและ ARDRA แสดงในภาคผนวกที่ 4

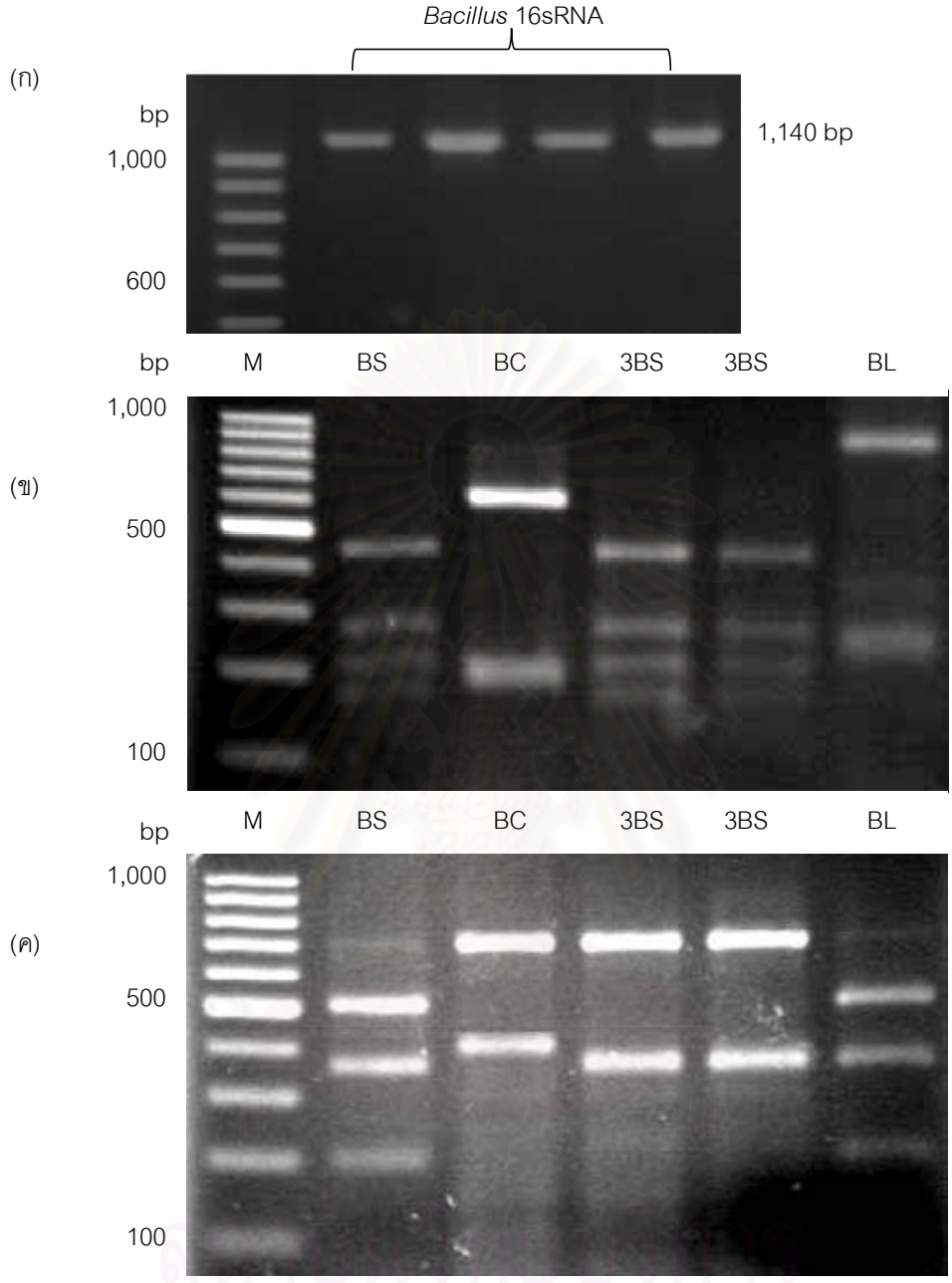
สำหรับ *B. cereus* เมื่อทำการยืนยันด้วยวิธี ARDRA จะได้เป็น *B. cereus* group ซึ่งประกอบด้วย *B. cereus*, *B. anthrasis* และ *B. thuringensis* ซึ่งไม่สามารถแยกเชื้อทั้ง 3 species นี้ได้ด้วยรูปแบบ ARDRA จึงส่งเชื้อ *B. cereus* group จำนวน 7 isolates จึงส่ง PCR products ของ 16sRNA ไปทำการตรวจหาลำดับเบสและพบว่าเป็น *B. cereus* ทั้งหมด

ตารางที่ 6 เชื้อ *Bacillus* ที่พิสูจน์ยืนยันด้วยวิธี ARDRA (*n* = 114)

เชื้อ	จำนวน (%)
B. subtilis	29 (25.4)
B. licheniformis	21 (18.4)
B. cereus	7 (6.1)
B. subtilis cluster[a]	57 (50)

[a] *B. subtilis* cluster ประกอบด้วย *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus*

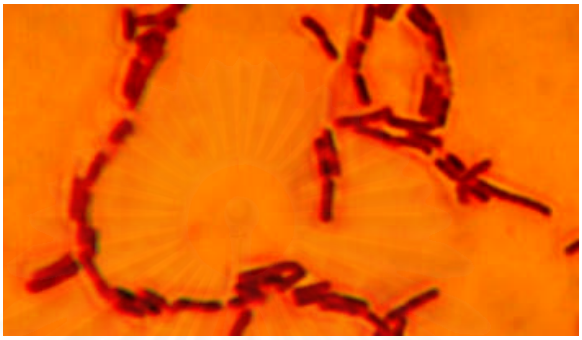
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 รูปแบบ ARDRA ที่ได้จากการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Bacillus* (ก) 16sRNA ของ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 1,140 bp (ข) ตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* และ (ค) ตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* โดย M, Molecular weight marker; BS, *B. subtilis*; BL, *B. licheniformis*; BC, *B. cereus* และ 3BS, *B. subtilis* cluster

1.2 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Lactobacillus* เมื่อย้อมด้วยวิธี Gram stain และตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อ *Lactobacillus* มีลักษณะเป็นท่อน ติดสีม่วง ดังรูปที่ 9



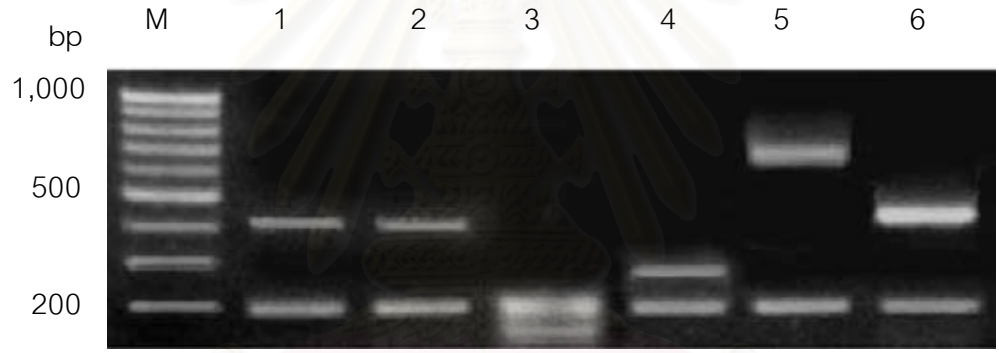
รูปที่ 9 เชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ
และย้อมด้วย Gram stain

จากการตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 97 isolates ตรวจพบ *Lactobacillus* จำนวน 4 species ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei* และ *L. plantarum* และจากการตรวจยืนยันด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าเป็น *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* และ *L. casei* group ดังตารางที่ 7 โดยมีรูปแบบของ PCR products ดังรูปที่ 10 ซึ่งผลการตรวจจำแนกเชื้อใน 2 วิธีดังกล่าวนั้น มีบางส่วนที่ผลการทดสอบไม่สอดคล้องกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. acidoplilus* จากการตรวจทางชีวเคมี เมื่อตรวจพิสูจน์ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าส่วนหนึ่งให้ผลเป็น *L. plantarum* และ *L. gasseri* รายละเอียดความแตกต่างของ *Lactobacillus* ที่ทดสอบด้วยวิธีทั้ง 2 แสดงในภาคผนวกที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 เชื้อ *Lactobacillus* ที่พิสูจน์ยืนยันด้วยเทคนิค multiplex PCR (*n* = 97)

เชื้อ	จำนวน (%)
L. plantarum	39 (40.2)
L. rhamnosus	27 (27.8)
L. gasseri	7 (7.2)
L. delbrueckii	15 (15.4)
L. casei group	9 (9.2)

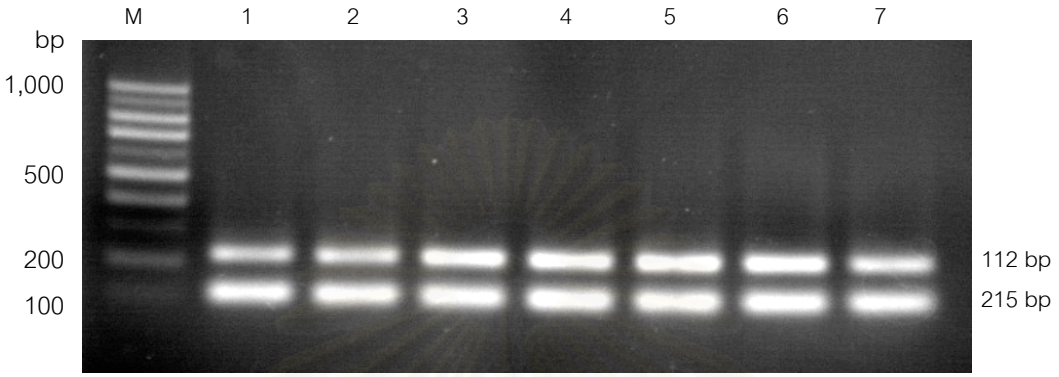


รูปที่ 10 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* ด้วยวิธี multiplex PCR. เชื้อ *Lactobacillus spp.* ให้ PCR products ขนาด ~200 bp และแต่ละ species จะให้ PCR products ขนาดต่างกัน โดย M, Molecular weight marker; lane 1, *L. plantarum* 428 bp; lane 2, *L. plantarum* 428 bp; lane 3; *L. delbrueckii* 184 bp; lane 4; *L. gasseri* 272 bp; lane 5; *L. casei* group 727 bp; lane 6; *L. rhamnosus* 448 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus*

เชื้อ *Enterococcus* ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 7 isolates เมื่อทำการยืนยัน genus และspecies ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าเป็น *E. faecium* ทั้ง 7 isolates ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Enterococcus* ด้วยวิธี multiplex PCR. เชื้อ *Enterococcus* ให้ PCR products ขนาด ~112bp และเชื้อ *E. faecium* จะให้ PCR product ขนาด 215bp โดย M, Molecular weight marker; lane 1-7, *E. faecium* ที่แยกได้

2. ชนิดและจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์

ผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะส่วนใหญ่มีจำนวนแบคทีเรียตามที่ระบุบนฉลาก ยกเว้น ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 3, 7, 8 และ 9 ที่มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าที่ระบุบนฉลาก และผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 10 ที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตทั้ง 3 ชนิด เมื่อพิจารณาชนิดของแบคทีเรียนั้น พบว่าผลิตภัณฑ์ทุกชนิดมีข้อบกพร่องในการระบุชนิดของเชื้อบนฉลาก โดยพบว่าผลิตภัณฑ์จำนวน 8 ชนิดตรวจพบ species ไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลาก ผลิตภัณฑ์จำนวน 4 ชนิดมีการตรวจพบ species มากกว่าที่ระบุไว้ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1, 2, 4 และ 6 ในขณะที่บางผลิตภัณฑ์ตรวจไม่พบ species ตามที่ระบุตามฉลาก เช่น ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 5, 7, และ 9 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1 ตรวจพบจำนวนเชื้อ *Bacillus* ตรงตามที่ระบุบนฉลาก แต่ตรวจพบ *B. licheniformis*, *B. subtilis* cluster, *L. plantarum* และ *L. gasseri* นอกเหนือจากที่ระบุบนฉลากผลิตภัณฑ์ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบจำนวนเชื้อ *Bacillus* ตรงตามที่ระบุบนฉลากแต่ตรวจพบ *B. licheniformis*, *B. subtilis* cluster และ *L. delbrueckii* นอกเหนือจากที่ระบุบนฉลากผลิตภัณฑ์ ส่วนในผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 3 มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* น้อยกว่าที่ระบุบน

ฉลากซึ่งผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ระบุว่ามี *B. subtilis* เท่านั้น แต่ผลการวิจัยพบว่ามีเชื้อ *B. subtilis* cluster ที่ประกอบด้วย *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus* อยู่ด้วย

ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 4 พบเชื้อทั้ง 3 genus คือ *Bacillus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* มีจำนวนตรงตามที่ระบุ แต่ตรวจพบ *B. cereus* และ *L. delbrueckii* นอกเหนือจากที่ระบุไว้ สำหรับผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 5 พบเชื้อครบทั้ง 3 genus ตามที่ระบุคือ *Bacillus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* เช่นกันแต่มีจำนวนน้อยกว่าที่ระบุบนฉลาก รวมทั้งยังพบแบคทีเรีย species อื่นๆ ที่นอกเหนือจากที่ระบุไว้ คือ *B. subtilis* cluster, *L. rhamnosus* และ *L. gasseri* แต่ตรวจไม่พบ *B. licheniformis* และ *L. acidoplilus* ตามที่ระบุบนฉลากผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 6 ตรวจพบจำนวนเชื้อ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ตรงตามที่ระบุบนฉลาก แต่ตรวจพบ *L.rhamnosus* และ *L. gasseri* นอกเหนือจากที่ระบุไว้ รวมถึงพบ *E. faecium* ในขณะที่ฉลากระบุว่าเป็น *S. faecium* สำหรับการตรวจพบ *B. subtilis* และ *B. subtilis* cluster นั้นในผลิตภัณฑ์ชนิดนี้นั้นไม่สามารถเปรียบเทียบชนิดตามที่ระบุบนฉลากได้ เนื่องจากตามฉลากระบุว่าเป็น *Bacillus* spp.

ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 7 ตรวจไม่พบ *L. acidoplilus* และ *E. faecium* ตามที่ระบุบนฉลาก แต่ตรวจพบ *B. subtilis* cluster และ *L. plantarum* นอกเหนือที่ระบุไว้ นอกจากนี้จำนวน *Lactobacillus* ที่ตรวจพบมีน้อยกว่าที่ระบุไว้ ส่วนผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 8 เชื้อที่ตรวจพบไม่ตรงกับที่ระบุบนฉลาก โดยที่ระบุว่ามี *B. subtilis* และ *L. acidoplilus* นั้น เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบ *B. subtilis*, *B. subtilis* cluster และ *L.plantarum* รวมถึงจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบนั้นมีน้อยกว่าที่ระบุไว้ และผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 9 ตรวจไม่พบ *E. faecium* และ *B. licheniformis* ตามที่ระบุ นอกจากนี้ตามที่ระบุว่ามี *B. subtilis* ตรวจพบว่าเป็น *B. subtilis* และ *B. subtilis* cluster โดยมีจำนวน *Bacillus* น้อยกว่าที่ระบุไว้ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 10 ตรวจไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus*

ตารางที่ 8 ผลการตรวจชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะ

ผลิตภัณฑ์	ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ		
	ชนิด	จำนวน	สายพันธุ์
1	*Bacillus* spp.	$1x10^9$	*B. subtilis*, *B. licheniformis*,
	Lactobacillus spp.	$6x10^8$	*B. subtilis* cluster, *L .plantarum*,
			L. gasseri
2	*Bacillus* spp.	$1x10^6$	*B. subtilis*, *B. licheniformis*,
	Lactobacillus spp.	8 x10	*B. subtilis* cluster,*L. delbrueckii*
3	*Bacillus* spp.	$9.4x10^6$	*B. subtilis* cluster
4	*Bacillus* spp.	$3.8x10^7$	*B. subtilis*, *B. licheniformis*,
	Lactobacillus spp.	$1.9x10^7$	*B. cereus*, *L. delbrueckii*,
	Enterococcus spp.	$1.1x10^7$	*E. faecium*
5	*Bacillus* spp.	$1.7x10^7$	*B. subtilis*, *B. subtilis* cluster,
	Lactobacillus spp.	$2.5x10^7$	*L. plantarum*, *L. rhamnosus*,
	Enterococcus spp.	$1.8x10^7$	*L. gasseri*, *E. faecium*
6	*Bacillus* spp.	$3.8x10^6$	*B. subtilis*, *B. subtilis* cluster,
	Lactobacillus spp.	$1.2x10^7$	*L. plantarum*, *L. rhamnosus*,
	Enterococcus spp.	$4.0x10^6$	*L.delbrueckii*, *E.faecium*
7	*Bacillus* spp.	$3.0x10^5$	*B. subtilis* cluster, *L. plantarum*
	Lactobacillus spp.	$2.5x10^3$	
8	*Bacillus* spp.	$1.4x10^8$	*B. subtilis*, *B. subtilis* cluster,
	Lactobacillus spp.	$4.2x10^8$	*L. plantarum*
9	*Bacillus* spp.	$1.3x10^8$	*B. subtilis*, *B. subtilis* cluster,
10	NF	NF	NF

NF หมายถึง ตรวจไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การปนเปื้อน *Salmonella* และ *E.coli*

จากการตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* และ *E.coli* นั้น ไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* หรือ *E.coli* ในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะทั้ง 10 ชนิด

4. ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำการทดสอบหาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ทั้งหมดที่แยกได้ โดยค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Bacillus* และ *Lactobacillus* แสดงดังตารางที่ 9 และ 10 เนื่องจากค่า breakpoints ของ LAB มีจากหลายหน่วยงานและยังไม่มีการกำหนดค่าที่เป็นมาตรฐานสากล ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงแสดงผลความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยการกระจายของค่า MIC โดยเมื่อต้องพิจารณาว่าเชื้อนั้นๆดื้อยาหรือไม่ จะใช้ค่า breakpoints ของ SCAN โดยอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* แสดงดังรูปที่ 11

จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* ทุกตัวที่แยกได้ ดื้อต่อยา gentamicin และดื้อต่อ ampicillin, kanamycin และ streptomycin ในอัตราสูง (91.5, 91.5 และ 92.7% ตามลำดับ) โดยไม่ดื้อต่อยา chloramphenicol, erythromycin และ rifampicin สำหรับ *Bacillus* นั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบในอัตราต่ำกว่า *Lactobacillus* โดยดื้อต่อยา tetracycline ในอัตราสูงสุด (12.2%) และไม่ดื้อต่อยา ciprofloxacin และ gentamicin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

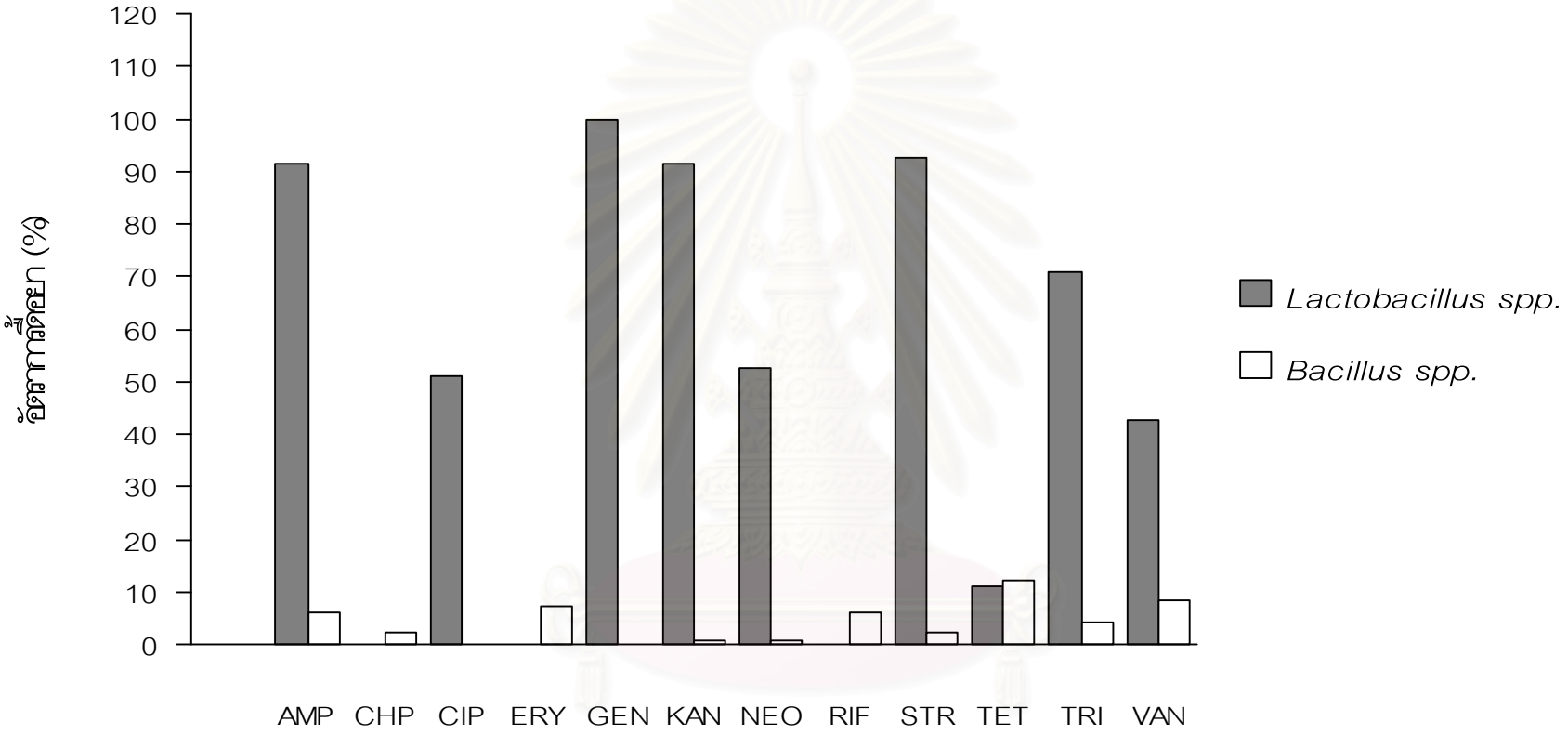
ตารางที่ 9 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Bacillus*

เชื้อ (n)	AMP	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
B. subtilis (29)	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 (21)	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 (57)	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 (7)	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 10 ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *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 (27)	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 (7)	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 (15)	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 (9)	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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (%) ของ *Lactobacillus (n* = 97 *)* และ *Bacillus (n* = 114*)*

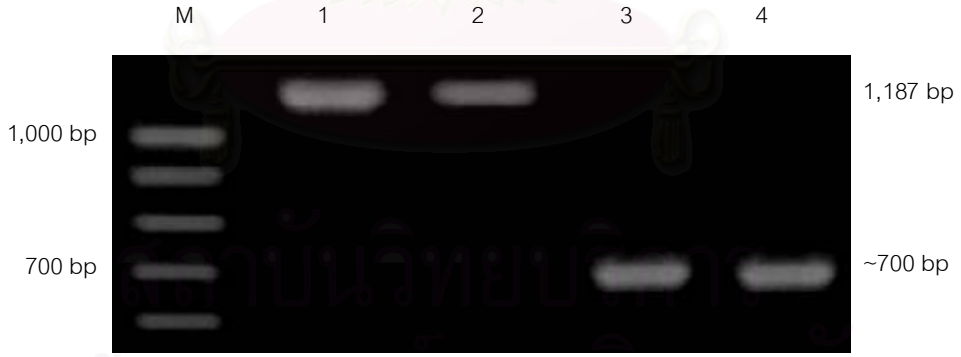
AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TRI, trimetroprim; VAN, vancomycin

5. การปรากฏของยีนดื้อยา

จากการตรวจหาการปรากฏของยีนที่ควบคุมการดื้อยาต่างๆ ของเชื้อ *Lactobacillus* นั้น ตรวจพบยีน *vanA* ซึ่งควบคุมการดื้อต่อยา vancomycin ในเชื้อ L7.3 (1)*L. delbrueckii* และตรวจพบยีน *tetW* ซึ่งควบคุมการดื้อต่อยา tetracycline ในเชื้อ L8.6 (1)*L. plantarum* ดังรูปที่ 13 ซึ่งเชื้อ 2 ตัวนี้ไม่มี plasmid แต่ตรวจไม่พบการปรากฏของยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* และยีน *aadE* ที่ควบคุมการดื้อต่อยา streptomycin

สำหรับเชื้อ *Bacillus* นั้น จากการตรวจหาการปรากฏของยีนควบคุมการดื้อต่อยา tetracycline, vancomycin และ streptomycin เช่นเดียวกับ *Lactobacillus* และตรวจการปรากฏของยีน *ermA*, *ermB* และ *ermC* ที่ควบคุมการดื้อต่อยา erythromycin โดยครอบคลุมเชื้อที่ดื้อยาแต่ละชนิดและมี plasmid ด้วยนั้น ไม่พบการปรากฏของยีนควบคุมการดื้อยาชนิดใดเลย

ส่วน *E. faecium* ทั้ง 7 isolates ได้ถูกนำมาตรวจหาการปรากฏของยีนทั้งหมดจาก whole cell DNA เช่นกัน พบการปรากฏของยีน *vanA* ซึ่งควบคุมการดื้อต่อยา vancomycin จำนวน 2 isolates เนื่องจากเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีก จึงไม่สามารถตรวจการปรากฏของ plasmid ได้



รูปที่ 13 การปรากฏของยีน *tetW* และ *vanA* โดย M, Molecular weight marker; lane 1-2, ยีน *tetW* ในเชื้อ *L. plantarum*; lane 3, ยีน *vanA* ในเชื้อ *L. Delbrueckii*; lane 4, ยีน *vanA* ในเชื้อ *E. faecium*

6. ความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา

จากการตรวจหาการปรากฏของ plasmid ของ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ทั้งหมดที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะ พบเชื้อ *Bacillus* ที่มี plasmid จำนวน 3 isolates จากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะชนิดที่ 8 โดยเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา vancomycin, erythromycin และ/หรือ rifampicin ดังตารางที่ 12 สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* พบเชื้อที่มี plasmid จำนวน 12 isolates ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1, 2, 10 และ 13 โดยเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ดังตารางที่ 13

จากการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาในครั้งนี้ ใช้เชื้อตัวที่พบว่ามี plasmid เป็นตัวให้ และ spontaneous tetracycline resistant derivative ของ *Bacillus* และ spontaneous rifampicin resistant derivative ของ *Lactobacillus* เป็นตัวรับ โดยค่าความไวต่อยาปฏิชีวนะของ spontaneous resistant ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ที่ใช้เป็นตัวรับแสดงดังตาราง 14

โดย *Lactobacillus* ตัวให้จำนวน 12 isolates ประกอบด้วย *L. plantarum* จำนวน 4 isolates *L. rhamnosus* จำนวน 4 isolates *L. casei* จำนวน 2 isolates *L. gaseri* และ *L. delbrueckii* อย่างละ 1 isolates ส่วนตัวรับคือ *L. plantarum* L11.1(2)rif^r (MIC = 128µg/ml) และ *L. plantarum* L11.5(2)rif^r (MIC = 128µg/ml) สำหรับเชื้อ *Bacillus* ตัวให้จำนวน 3 isolates เป็น *B. cereus* จำนวน 2 isolates และ *B. licheniformis* 1 isolates ส่วนตัวรับ คือ *B. subtilis* B1.6 tet^r (MIC =128 µg/ml) และ *B. licheniformis* B10.2tet^r ดื้อต่อยา (MIC =128 µg/ml) ซึ่งผลการศึกษาไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาทั้งการถ่ายทอดระหว่าง species เดียวกันและการถ่ายทอดระหว่างต่าง species ในเชื้อที่ใช้ทดสอบนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

No	ID[a]	Strain	Reistance pattern	MIC (µg/ml)[b]									
				AMP	ERY	GEN	KAM	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
1	B7.8	*B. cereus*	ERY- VAN	1	>32	2	2	8	8	16	0.25	1	16
2	B7.9	*B. cereus*	RIF-VAN	1	0.25	1	2	8	16	4	0.25	1	16
3	B7.10	*B. licheniformis*	RIF-VAN	1	0.25	2	2	8	8	1	16	0.25	15

[a] B หมายถึง *Bacillus* เลขตัวแรกหมายถึงผลิตภัณฑ์ชนิดที่และเลขตัวหลัง หมายถึง โคโลนีที่ เช่น B7.8 หมายถึง *Bacillus* แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 7 โดยเป็นโคโลนีที่ 8 ที่เก็บไว้

[b] AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TRI, trimetroprim; VAN, vancomycin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 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	L10.1	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-STR-VAN	2	4	2	0.5	4	0.25	16	8	16	4
5	L10.4	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-VAN	4	16	1	64	8	0.25	16	8	4	>32
6	L10.10	*L. casei* group	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-VAN	2	4	2	64	16	0.25	64	4	16	>32
7	L10.14	*L. casei* group	AMP-CIP-GEN-KAN-STR	2	4	2	32	8	0.25	64	4	8	0.25
8	L10.1	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI-VAN	2	4	4	64	16	0.25	64	8	64	16
9	L10.2	*L. rhamnosus*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI	2	4	4	32	16	0.25	64	8	64	>32
10	L10.5	*L. rhamnosus*	AMP-GEN-KAN-NEO-STR	2	1	>4	>128	128	16	64	8	16	2
11	L13.2	*L.plantarum*	AMP-GEN-KAN-STR-TRI	2	0.5	>4	>128	16	16	64	1	32	1
12	L13.5	*L.plantarum*	AMP-CIP-GEN-KAN-STR-TRI	4	0.5	>4	>128	16	16	64	1	64	1

[a] B หมายถึง *Bacillus* เลขตัวแรกหมายถึงผลิตภัณฑ์ชนิดที่และเลขตัวหลัง หมายถึง โคโลนีที่ เช่น B7.8 หมายถึง *Bacillus* แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 7 โดยเป็นโคโลนีที่ 8 ที่เก็บไว้

[b] AMP, ampicillin; CHP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TRI, trimetroprim; VAN, vancomycin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ค่าความไวต่อยาปฏิชีวนะของ spontaneous resistant ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus*

เชื้อ	AMP	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	RIF	STR	TET	TRI	VAN
L11.1(2)	2	8	1	0.25	>4	0.5	16	0.25	32	8	>64	0.25
L11.1(2)rif^r	2	8	1	0.25	>4	0.5	16	128	32	8	>64	0.25
L11.5(2)	8	8	>16	0.25	2	0.5	1	0.25	2	0.5	0.5	0.25
L11.5(2)rif^r	8	8	>16	0.25	2	0.5	1	128	2	0.5	0.5	0.25
B1.6	0.25	8	0.125	0.5	0.5	1	0.5	0.25	2	0.5	0.5	0.25
B1.6 tet^r	0.25	8	0.125	0.5	0.5	1	0.5	0.25	2	128	0.5	0.25
B10.2	0.25	8	0.125	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	2	0.5	0.5	0.25
B10.2tet^r	0.25	8	0.125	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	2	128	0.5	0.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบันการใช้สารเสริมชีวนะเป็นที่นิยมและมีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อบริโภคมากขึ้น เป็นผลจากที่สหภาพยุโรปเพิกถอนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคและประกอบกับการสนับสนุนการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์ โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่จะนำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะนั้นต้องเป็นไปตามมาตรฐานด้านความปลอดภัยหรือ GRAS ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ โดยแบคทีเรียกลุ่มที่นิยมใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Bacillus* จากการที่แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาผลิตสารเสริมชีวนะอย่างเข้มงวด โดยนอกจากมีความปลอดภัยตาม GRAS แล้วแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะต้องเป็นแบคทีเรียที่ไม่มียีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ ซึ่งในยุโรปมีการออกข้อกำหนด Regulation (EC) No. 1831/2003 ที่มีการกำหนดให้มีการตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ของแบคทีเรียก่อนนำมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ (Saarela et al., 2000) ในขณะที่ประเทศไทยมีเพียงพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ที่กำหนดเพียงชนิดและจำนวนแบคทีเรียที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้เท่านั้น แต่ยังไม่มีการกำหนดแนวทางที่ชัดเจนในการคัดเลือกแบคทีเรียมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ รวมถึงยังไม่มีการควบคุมการใช้สารเสริมในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่างชัดเจน ซึ่งเห็นได้จากตัวอย่างสารเสริมชีวนะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่บางชนิดนั้นยังไม่มีการขึ้นเลขทะเบียนอาหารสัตว์อย่างถูกต้อง นอกจากนี้พบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายจริงในท้องตลาดมีประมาณ 30 ชนิด ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ตามที่ระบุใน Veterinary and Animal Health Products Directory มีเพียง 8 ชนิดเท่านั้น

จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบในสารเสริมชีวนะทั้งหมด ได้แก่ *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* และ *L. casei* group ซึ่ง *L. plantarum*, *L. delbrueckii* และ *L. casei* นั้นเป็นชนิดที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ในขณะที่ *L. rhamnosus* นั้นไม่ได้

เป็นชนิดที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามพระราชบัญญัติ แต่เป็นชนิดที่ EU อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้ (Coeuret et al., 2004) ซึ่งในผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 5 และ 6 ที่ตรวจพบ *L. rhamnosus* นั้นไม่มีการระบุแบคทีเรียชนิดนี้ไว้บนฉลากด้วย ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยจะมี *L. rhamnosus* เป็นส่วนประกอบอยู่แล้ว แต่ที่ไม่มีการระบุบนฉลากอาจเนื่องจากข้อจำกัดในวิธีทดสอบของผู้ผลิตที่ใช้วิธีทางชีวเคมีในการทดสอบยืนยัน species เท่านั้น รวมทั้งอาจใช้แบคทีเรียตั้งต้น (seed) ตัวเดิมในการผลิตสารเสริมชีวนะมาเป็นเวลานานและไม่มีการตรวจระบุยืนยัน species อีกครั้งด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงยังไม่มีการแก้ไขการระบุ species ของแบคทีเรียที่ใช้ ซึ่ง *L. rhamnosus* มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกับ *L. casei* , *L. paracasei* และ *L. plantarum* เป็นอย่างมาก (Zhong et al., 1998) จึงทำให้เกิดการระบุ species ที่ผิดพลาดได้ง่าย

ผลการวิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มี species ของ *Lactobacillus* นอกเหนือจากที่ระบุบนฉลากผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 4 พบ *L. delbrueckii* ซึ่งไม่ระบุไว้บนฉลาก ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 6 ตรวจพบ *L. rhamnosus* และ *L. gasseri* ในขณะที่ระบุว่ามี *L. rhamnosus* เท่านั้น เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Lactobacillus* ที่ตรวจพบในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีจำหน่ายในประเทศแถบยุโรปนั้นมี species ไม่ตรงกับข้อมูลที่แสดงบนฉลากผลิตภัณฑ์เช่นกัน (Hamilton-Miller et al., 1999) การตรวจพบ species ที่ไม่ตรงกับที่ระบุบนฉลากนั้นอาจเนื่องจากความไม่จำเพาะหรือข้อจำกัดของเทคนิคในการจำแนกชนิดแบคทีเรียของบริษัทผู้ผลิต ที่อาจมีการตรวจระบุ species ของเชื้อตั้งต้นด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่สามารถระบุชนิด species ของ *Lactobacillus* ได้ถูกต้องแม่นยำ (Bernardeau et al., 2007) นอกจากนี้อาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ของผู้ผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่าง *Lactobacillus* species ต่างๆ ในเชื้อตั้งต้นสำหรับการผลิตสารเสริมชีวนะ ทำให้มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์รุ่นต่อๆ มา

เช่นเดียวกับเชื้อ *Bacillus* ในผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ที่ระบุบนฉลากว่าประกอบด้วย *B. subtilis* เพียงชนิดเดียวนั้น แต่จากผลการทดสอบพบ *Bacillus* species อื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. subtilis* cluster ที่ประกอบด้วย *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus* (Wu et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Green และคณะ (1999) ที่พบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริม ชีวนะส่วนใหญ่ที่ระบุบนฉลากว่าเป็น *B. subtilis* นั้น เมื่อทดสอบทางห้องปฏิบัติการแล้วพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* ใน species อื่นๆ เช่น *B. clausii, B. pumilus* และ *B. cereus* เป็นต้น จากการศึกษาครั้งนี้ species ของเชื้อ *Bacillus* ที่ตรวจพบจากผลิตภัณฑ์

ทั้งหมด คือ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* และ *B. subtilis* cluster ซึ่งเชื้อ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus* ที่ตรวจพบนั้น ไม่ได้จัดอยู่ในแบคทีเรียที่อนุญาตให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ได้ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ในขณะที่ในยุโรปนั้นอนุญาตให้ใช้ *B. amyloliquefaciens* ผลิตเป็นสารเสริมชีวนะได้ (Guarner and Schaafsma, 1998)

ถึงแม้ว่า *Lactobacillus* และ *Bacillus* จะเป็น GRAS ที่สามารถผลิตเป็นสารเสริมชีวนะได้ แต่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้จริง เนื่องจากบางสายพันธุ์นั้นสร้างสารพิษหรือก่อโรคได้ เช่น *L. gasseri* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยสูงอายุและผู้ป่วยที่มีภาวะโรคเบาหวาน (Dickgieber et al., 1984) ส่วน *B. licheniformis* ทำให้เกิดอาการ toxemia และแท้งในโคได้ (Nieminen et al., 2007) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธี ARDRA ในการตรวจสอบยืนยัน *Bacillus* spp. ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีทางชีวเคมีแต่ก็ยังมีข้อจำกัด โดยไม่สามารถจำแนก *B. cereus* cluster ที่ประกอบด้วย *B. cereus*, *B. anthrasis* และ *B. thuringensis* และ *B. subtilis* cluster ได้ (Wu et al., 2005) ซึ่ง *B. cereus* และ *B. thuringensis* สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษในคน ส่วน *B. anthracis* เป็นสาเหตุของโรค anthrax ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ตรวจพบ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 4 แต่ไม่มีการระบุเชื้อชนิดนี้ไว้บนฉลาก นอกจากนี้ *B. pumilus* ใน *B. subtilis* cluster ยังสามารถก่อโรคที่มีอาการคล้าย listeriosis ได้ (Rubinstein and Pedersen, 2002) ดังนั้นการระบุ species ที่ผิดพลาดโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษหรือก่อโรคนั้นก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพร่างกายของสัตว์ได้

สำหรับ *E. faecium* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 5 และ 6 นั้น ตามข้อมูลที่ระบุบนฉลากเป็น *Streptococcus faecium* ซึ่งในปัจจุบัน *Streptococcus* กลุ่ม D เช่น *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium* (Franz et al., 1999) ได้จัดเป็นเชื้อกลุ่ม *Enterococcus* แล้ว ความผิดพลาดนี้อาจเกิดจากความตั้งใจของผู้ผลิตหรือการที่ผู้ผลิตใช้เชื้อตั้งต้นชนิดเดิมที่ใช้กันมานานโดยไม่ได้มีการตรวจระบุชนิดขึ้นใหม่ ซึ่งการระบุเช่นนี้ถือเป็นการบิดเบือนข้อมูลและทำให้เกิดความเข้าใจที่ไม่ถูกต้องได้ ซึ่งการพบเชื้อ *E. faecium* เป็นสิ่งที่ต้องให้ความระมัดระวังเพราะเชื้อชนิดนี้เป็นตัวการสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อที่ดื้อต่อยา vancomycin ด้วย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียเสริมชีวนะที่มีชีวิตด้วยเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพราะประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะขึ้นกับจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดจำนวนที่แน่นอนของแบคทีเรีย

มีชีวิตเพื่อให้ให้เกิดผลในการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ มีเพียงแต่การแนะนำให้ในจำนวนอย่างน้อย10^9 CFU/g (Jayamanne and Adams, 2006) เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพสัตว์ โดยทั่วไปสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์มีแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบประมาณ 10^9 – 10^{10} CFU/g โดยพระราชบัญญัติอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 กำหนดให้สารเสริมชีวนะที่เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้มีเชื้อในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU/kg ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้ง 10 ชนิดที่ศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิดประมาณ 10^9 – 10^{10} CFU/g ซึ่งมากกว่าที่กำหนดตามพระราชบัญญัติ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาข้อมูลที่แสดงบนฉลากพบว่ามีบางผลิตภัณฑ์ที่มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าที่ระบุบนฉลาก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 3, 7, 8 และ 9 และจากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียของสารเสริมชีวนะชนิดที่ 10 ไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ซึ่งขณะที่ทำการตรวจนั้นยังไม่ถึงวันหมดอายุ ข้อบกพร่องนี้อาจเกิดมาจากการผลิตที่ไม่ได้คุณภาพตั้งแต่ต้นหรือเนื่องจากผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกา จึงเป็นไปได้ที่ระยะเวลาในการขนส่งที่ยาวนานประกอบกับการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม ทำให้สูญเสียแบคทีเรียมีชีวิตที่เป็นส่วนประกอบดังกล่าวหรือแบคทีเรียมีชีวิตในสารเสริมชีวนะจะมีจำนวนลดลงในระหว่างที่ที่มีการวางจำหน่าย อย่างไรก็ตามสิ่งเหล่านี้ส่งผลให้สารเสริมชีวนะชนิดนี้ไม่มีประสิทธิภาพใดๆ เลย

ผลการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้นั้น ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในอัตราสูง เช่น ampicillin, kanamycin, vancomycin และ ciprofloxacin คิดเป็น 91.5, 91.5, 42.7 และ 51.2% สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่า *Lactobacillus* มักดื้อต่อยา ampicillin, vancomycin และ ciprofloxacin (Kastner et al., 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ LAB จำนวน 187 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะที่มีจำหน่ายในประเทศแถบยุโรป พบเชื้อนี้ดื้อต่อยา kanamycin, vancomycin, tetracycline, penicillin G และ chloramphenicol คิดเป็น 79, 65, 26, 23 และ 11% ตามลำดับ โดยที่ 68.4% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน (Temmerman et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า *L. plantarum* (Ferain et al., 1996) และ *L. rhamnosus* (Tynkkynen et al., 1998) ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะดื้อต่อยา vancomycin โดยไม่พบการปรากฏของยีน *van* และเป็นการดื้อต่อ vancomycin โดยธรรมชาติของเชื้อ สำหรับการดื้อยาของเชื้อ *Bacillus* พบว่ามีอัตราการดื้อยาต่ำกว่าเชื้อ *Lactobacillus* โดยส่วนใหญ่ของเชื้อดื้อต่อ tetracycline คิดเป็น 12.2% ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Bacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะในประเทศแถบยุโรปนั้นดื้อต่อ penicillin, ampicillin และ cephalosporins (Bernhard et al., 1978) ซึ่งถ้าเชื้อเหล่านี้มีการดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายในและสามารถพิสูจน์ได้ว่าไม่มีการถ่ายทอดยีนดื้อยานั้นก็ยังสามารถพิจารณาใช้เป็น

สารเสริมชีวนะได้ (SCAN, 2003) แต่ถ้าการดื้อยานั้นเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับยีนดื้อยาหรือตัวระบุการดื้อยาอื่นๆ และสามารถถ่ายทอดได้ก็จะไม่สามารถนำแบคทีเรียเหล่านั้นมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ เพราะอาจเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาต่อไป ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นเหตุผลสำคัญในความจำเป็นที่จะต้องพิจารณาเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะโดยทดสอบด้านพันธุกรรมการดื้อยาด้วย

การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจพบยีน *vanA* ในเชื้อ *L. delbrueckii* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 7 และพบยีน *tetW* ในเชื้อ *L. plantarum* แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชนิดที่ 8 อย่างละ 1 เชื้อเท่านั้น โดยปกติที่ปลายของสาย peptidoglycan ประกอบด้วย D-alanyl-D-alanine แต่ยีน *vanA* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ ligase ที่นำ D-alanyl-D-lactate มาเชื่อมแทน ทำให้ยา vancomycin ไม่สามารถจับกับตำแหน่งเป้าหมายและไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ส่งผลให้เกิดการดื้อยาขึ้น ซึ่งการแสดงออกของยีน *vanA* ขึ้นกับการทำงานของยีน *vanS* และ *vanR* ซึ่งยีน v*anA* เป็น structural gene อยู่บน the *vanA* cluster ที่ประกอบด้วยยีนต่างๆ อีก 6 ชนิด ได้แก่ *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY* และ *vanZ* ทั้งยีน *vanS* และ *vanR* ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของยีนบน cluster โดยเมื่อมีการปรากฏของตัวเหนี่ยวนำ (inducible agents) เช่น vancomycin จะกระตุ้นกระบวนการ autophosphorylation ที่ histidine residuce ของ VanS และมีการส่ง phosphate ไปยัง VanR จากนั้น phosphorylated VanR จะกระตุ้นการแปลรหัส (transcription) ของ structural genes บน the *vanA* cluster (Fischetti et al., 2000) และส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา vancomycin และยา teicoplanin ในระดับสูง (Lai and Kirsch, 1996) จากการศึกษาของ Patel (2000) พบยีน *vanA* ใน *L. confusa* และ *L. viridescens* ซึ่งเป็น clinical isolates ที่แยกได้จากคน เชื้อเหล่านี้ดื้อต่อยา vancomycin และสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยานี้ไปยังเชื้อ *Enterococcus* ได้ ซึ่งการดื้อยาที่เกิดจากยีน *vanA* นี้ไม่ใช่เป็นการดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายในของเชื้อเพราะยีน *vanA* ไม่ได้ปรากฏอยู่บนโครโมโซมของ *Lactobacillus* โดยธรรมชาติแต่เป็นการได้รับการถ่ายทอดมาจากภายนอกเซลล์และยังสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Lai and Kirsch, 1996) โดยมีการศึกษาพบว่ายีน *vanA* นั้นสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Stapylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus* spp. รวมถึง *Enterococcus* (Patel, 2000) ซึ่งถ้าเกิดการถ่ายทอดไปยัง *Enterococcus* ก็จะกลายเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดปัญหาการดื้อต่อยา vancomycin หรือ Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) ขึ้นได้

สำหรับยีน *tetW* นั้นจะสร้างโปรตีน TetW ซึ่งเป็น ribosomal protection protein ไปจับที่ ribosome ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ tetracycline ส่งผลให้ยา tetracycline จับกับตำแหน่งเป้าหมายได้ลดลงและเกิดการดื้อยาขึ้น โดยทั่วไปยีน *tetW* พบได้ในแบคทีเรียที่อยู่ใน rumen ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง แต่มีรายงานการพบชิ้นส่วน DNA ที่มีความคล้ายกับยีน *tetW* มากถึง 99.9% ในเชื้อที่แยกได้จากคน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อที่แยกได้จากคนและสัตว์ (Scott et al., 2000)การศึกษาก่อนหน้านี้ตรวจพบยีน *tetW* ในเชื้อ *L. paracasei* ที่ดื้อต่อยา tetracycline ที่แยกได้จากเนยแข็ง (Huys et al., 2008) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการพบยีนนี้ใน *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ ที่ผ่านมาพบยีน *tetW* ใน *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับมนุษย์ซึ่งในการศึกษาครั้งนั้นยังพบการปรากฏของยีน *tetM* ด้วย (Klare et al., 2007) ส่วนยีน *tet* อื่นๆ ที่พบใน *Lactobacillus* ที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะ ได้แก่ ยีน *tetS* ที่มีการตรวจพบบน plasmid ในเชื้อ *L. plantarum* เป็นต้น (Huys et al., 2006) โดยปกติยีน *tetW* ไม่ได้ปรากฏอยู่ใน *Lactobacillus* โดยธรรมชาติอยู่แล้ว การดื้อยาที่เกิดจากยีน *tetW* นั้นเป็นการดื้อยาจากปัจจัยภายนอกและมีโอกาสที่จะถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้เช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด แต่ผลการวิจัยไม่พบการปรากฏของยีน *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS, aadE*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *vanB* และ *vanC* ซึ่งการเลือกศึกษาการปรากฏของยีนดังกล่าวเนื่องจากเป็นยีนที่เคยมีรายงานการปรากฏในแบคทีเรียเสริมชีวนะมาก่อนหน้านี้ (Dutka-Malen et al., 1995; Klare et al., 2007; Sutcliffe et al., 1996; Werner et al., 2003) การดื้อยาในเชื้อที่ไม่มีการปรากฏของยีนที่ทดสอบเหล่านี้น่าจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น การกลายพันธุ์บนโครโมโซม กลไก multidrug efflux pump รวมถึงเกิดจากยีนดื้อยาชนิดอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษากลไกการดื้อยาอื่นๆ ในแบคทีเรียเสริมชีวนะเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้ยังตรวจพบยีน *vanA* ในเชื้อ *E. faecium* ซึ่งมีความสำคัญมากในแง่การแพร่กระจายยีนดื้อยาเนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่ายีน *vanA* สามารถถ่ายทอดจาก *E. faecium* ที่แยกได้จากสัตว์ไปยัง *E. faecalis* ที่แยกได้จากมนุษย์ได้ จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อต่อยา vancomycin หรือ VRE ในมนุษย์ได้ (Lund and Edlund, 2001) รวมทั้งจากการศึกษาของ Mater และคณะ (2008) ที่พบว่ายีน *vanA* ของเชื้อ *Enterococcus* สามารถถ่ายทอดไปยัง *L. acidoplilus* ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่ายีน *vanA* สามารถถ่ายทอดจาก *E. faecium* ไปยังเชื้อ *E. faecium* ตัวอื่นที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะอีกด้วย (Lund and

Edlund, 2001) ดังนั้น *E. faecium* ที่ตรวจพบยีน *vanA* จึงไม่ควรนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ เพราะอาจกลายเป็นตัวการในการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ การปรากฏของ plasmid และความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ *E. faecium* ได้ เนื่องจากเชื้อที่เก็บไว้นั้นไม่สามารถเจริญได้อีก

จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบการปรากฏของ plasmid ในเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 15 isolates และ *Bacillus* จำนวน 3 isolates ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบ plasmid *ในเชื้อ Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ เนื้อดิบและอุจจาระ โดยพบว่า *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์สามารถมี plasmid ได้หลายชนิดอยู่แล้ว (Wang and Lee, 1997) ในขณะที่ตรวจพบการปรากฏของ plasmid ในเชื้อ *Bacillus* น้อยกว่ามาก (Levanova et al., 2007) อย่างไรก็ตามที่ผ่านมามีการศึกษาพบว่า *B. clausii* ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้นมีการปรากฏของยีน *erm* ที่ควบคุมการดื้อต่อยา erythromycin บน plasmid และสามารถถ่ายทอดไปยัง *B. subtilis*, *E. faeium* และ *E. faecalis* ได้ (Ammor et al., 2008) ดังนั้นพบ plasmid ที่มียีนดื้อยาในเชื้อ *Lactobacillus* หรือ *Bacillus* ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะและ plasmid นั้นสามารถถ่ายทอดได้ ก็จะเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้ไม่ต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* และ *Bacillus* ในสารเสริมชีวนะที่ทดสอบไม่น่าเป็นสาเหตุของการถ่ายทอดยีนดื้อยา tetracycline, vancomycin, streptomycin และ erythromycin อย่างไรก็ตามอาจมียีนควบคุมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ นอกเหนือการศึกษาวิจัยครั้งนี้ที่อยู่บน plasmid แล้วสามารถถ่ายทอดได้ รวมถึงการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของการศึกษาครั้งนี้อาจมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเชื้อตัวรับที่ไม่มีความหลากหลายและอาจเป็นเชื้อที่ไม่มีความสามารถในการเป็นตัวรับ plasmid ที่ดี ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยใช้ตัวรับ species อื่นๆ ต่อไป

สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 2 isolates ที่ตรวจพบยีน *vanA* และ *tetW* ตามที่กล่าวข้างต้นนั้นไม่มีการปรากฏของ plasmid แสดงว่า เชื้อทั้ง 2 ไม่สามารถถ่ายทอดยีน *vanA* และ *tetW* ด้วยวิธี mating ได้ แต่ไม่ได้หมายความว่ายีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะไม่ถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวอื่นๆ ได้เลย เพราะการถ่ายทอดยีนดื้อยามีหลายแบบ เช่น transformation โดยเมื่อเชื้อนั้นตายลงแล้วปล่อยชิ้นส่วนของยีนดื้อยาออกสู่สิ่งแวดล้อม แบคทีเรียตัวอื่นอาจจะสามารถรับชิ้นส่วนของยีนดื้อยานั้นเข้าไปแล้วเคลื่อนที่ (integrate) เข้าสู่โครโมโซมและเกิด recombination ขึ้น ส่งผลให้เชื้อนั้นเกิดการดื้อยาขึ้นได้ ซึ่งการถ่ายทอดแบบนี้สามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกัน

หรือต่างชนิด รวมถึงแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะถ้าเกิดการถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียก่อโรค ก็จะก่อให้เกิดปัญหาต่อการรักษาโรคตามมาได้ ดังนั้นไม่ควรนำเชื้อที่พบยีนดังกล่าวมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ

การศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* และ *E.coli* โดยทั่วไปโอกาสที่จะตรวจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* และ *E.coli* ในสารเสริมชีวนะชนิดแห้งนั้นค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แต่ถ้ามีการตรวจพบการปนเปื้อนจะแสดงให้เห็นว่ามีความผิดพลาดเกิดขึ้นในกระบวนการผลิต จำเป็นต้องมีการควบคุมระบบการผลิตให้ได้มาตรฐาน เพราะเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่เพียงแต่เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษเท่านั้น แต่ยังมีความสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา โดยมีการศึกษาพบการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันและสามารถถ่ายทอดตัวระบุการดื้อยาได้ ซึ่งตัวระบุการดื้อยาที่ตรวจพบคือ integrons ที่สามารถแพร่กระจายได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและลบ ดังนั้น *Salmonella* และ *E.coli* อาจเป็นแหล่งการแพร่กระจายการดื้อยาไปยังแบคทีเรียในสารเสริมชีวนะรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยในแง่การเป็นสาเหตุการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยทำการศึกษาระบุสายพันธุ์และจำนวนของแบคเรีย ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะดังกล่าว ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาได้ดังนี้

1. แบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะที่ทำการศึกษาส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียดื้อยา โดย *Lactobacillus* มีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบสูงกว่า *Bacillus* และมีการปรากฏของ plasmid ทั้งในเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้

2. ตรวจพบยีน *tetW* และ *vanA* ในแบคทีเรียเสริมชีวนะ ซึ่งที่ไม่ได้มีอยู่แล้วโดยธรรมชาติ แต่ไม่มีการปรากฏของ plasmid ในเชื้อที่ตรวจพบยีนดังกล่าว จึงไม่เกิดการถ่ายทอดยีน *vanA* และ *tetW* ด้วยวิธี mating ได้ อย่างไรก็ตามอาจเกิดการถ่ายทอดยีน *tetW* และ *vanA* ด้วยวิธี transformation ไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะการถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียก่อโรค ก็จะก่อให้เกิดปัญหาต่อการรักษาโรคตามมาได้ ดังนั้นไม่ควรนำเชื้อที่พบยีนดังกล่าวมาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะ

3. ไม่พบการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยา tetracycline, vancomycin, streptomycin และ erythromycin ของ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ในผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะที่ทำการศึกษา อย่างไรก็ตามอาจมียีนดื้อยาชนิดอื่นๆ นอกเหนือการศึกษาวิจัยครั้งนี้ที่อยู่บน plasmid แล้วสามารถถ่ายทอดได้ รวมถึงวิธีทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาของการศึกษาครั้งนี้นั้นอาจมีข้อจำกัดในเรื่องเชื้อตัวรับที่ไม่มีความหลากหลาย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาอื่นๆ และการใช้ตัวรับ species อื่นๆ ต่อไป

4. ผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะส่วนใหญ่มีการระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นส่วนประกอบบนฉลากของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้อง แสดงถึงการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียตั้งต้นที่ไม่มีประสิทธิภาพ อาจเป็นผลจากไม่นำวิธีการทดสอบใหม่ๆ ที่มีความแม่นยำสูงกว่ามาใช้ทดสอบ รวมถึงกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพ

5. การระบุจำนวนของแบคทีเรียบนฉลากผลิตภัณฑ์บางชนิดไม่ถูกต้อง โดยผลิตภัณฑ์บางชนิดมีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตต่ำกว่าที่มีอยู่จริง และบางชนิดไม่พบแบคทีเรียที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพ เกิดการสูญเสียแบคทีเรียมีชีวิตจากการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม รวมถึงแบคทีเรียที่ไม่แข็งแรงทำให้ไม่สามารถไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้จนถึงกำหนดวันหมดอายุ

จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นของการมีข้อกำหนดในการควบคุมการผลิตและการนำเข้าผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อย่างเข้มงวด โดยมีการกำหนดแนวทางการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ที่ชัดเจนและถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ รวมถึงสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์อย่างต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่มีคุณภาพและปลอดภัย โดยมีข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต ดังนี้

1. ศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ (fingerprinting) ของแบคทีเรียที่ตรวจพบกับสายพันธุ์ของเชื้อมาตรฐาน เนื่องจากแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันแต่ละต่างสายพันธุ์ จะมีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันและสามารถก่อโรคหรือสร้างสารพิษที่ต่างกัน

2. ศึกษาคุณภาพของสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ เรื่องจำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ตั้งแต่เมื่อถูกผลิตออกมา ระหว่างการเก็บรักษาและเมื่อนำมาใช้ในฟาร์ม ซึ่งจะทำทราบข้อมูลด้านคุณภาพของสารเสริมชีวนะเหล่านี้ว่าสามารถคงคุณภาพตามที่ระบุได้จริงหรือไม่ รวมถึงทราบประโยชน์ที่สัตว์จะได้รับจากสารเสริมชีวนะเมื่อถูกนำมาใช้ในฟาร์ม

3. ศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของสารเสริมชีวนะที่จำหน่ายเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำเพราะมีการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ อย่างกว้างขวางและใช้ในปริมาณมากเช่นกัน

4. ศึกษาการใช้แบคทีเรียตัวรับที่หลากหลายและเทคนิคการถ่ายทอดยีนดื้อยาอื่นๆ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบว่า *Lacobacillus* และ *Bacillus* มี plasmid แต่ไม่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัดในการวิจัย เช่น เทคนิคที่เลือกใช้ ความสามารถในการรับพลาสมิดของตัวรับ ซึ่งการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องนี้ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเรื่องการถ่ายทอดยีนดื้อยาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ศศิ เจริญพจน์. 2003 (2546). ยาต้านจุลชีพเพื่อการเลี้ยงสัตว์และความปลอดภัยผู้บริโภค : ยาสัตว์ตกค้าง ความปลอดภัยทางอาหารและการคุ้มครองผู้บริโภค. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพมหานคร. 96-115.

Ahn, C., Collins-Thompson, D., Duncan, C. and Stiles, M.E. 1992. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. Plasmid. 27(3): 169-176.

APHA. 2004. Probiotic. In :Animal Health Products Association. Bangkok. 353-355.

Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R.I. 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(1): 22-32.

Ammor, M.S., Florez, A.B., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Aarts, H.J., Margolles, A. and Mayo, B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 14(1-3): 6-15.

Axelsson, L.T., Ahrne, S.E., Andersson, M.C. and Stahl, S.R. 1988. Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. Plasmid. 20(2): 171-174.

Barrow, G.I., Feltham, R.K.A 1993. Characters of gram-positive bacteria. In : Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge. 50-93.

Becquet, P. 2003. EU assessment of *Enterococci* as feed additives. Int. J. Food. Microbiol. 88(2-3): 247-254.

Begley, M., Gahan, C.G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS. Microbiol. Rev. 29(4): 625-651.

Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. and Gueguen, M. 2007. The *Lactobacillus* genus. Int. J. Food. Microbiol.

Bernhard, K., Schrempf, H. and Goebel, W. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 133(2): 897-903.

Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F.M., Frey, J. and Nicolet, J. 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in *Enterococci* from pigs. J. Clin. Microbiol. 39(11): 4193-4195.

Bryan, A., Shapir, N. and Sadowsky, M.J. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 70(4): 2503-2507.

Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C.H., Wang, M.H., Yeh, C.M., Weill, F.X. and Chu, C. 2006. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 44(7): 2354-2358.

Coeuret, V., Gueguen, M. and Vernoux, J.P. 2004. Numbers and strains of *Lactobacilli* in some probiotic products. Int. J. Food. Microbiol. 97(2): 147-156.

Danielsen, M. and Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food. Microbiol. 82(1): 1-11.

Delsol, A.A., Randall, L., Cooles, S., Woodward, M.J., Sunderland, J. and Roe, J.M. 2005. Effect of the growth promoter avilamycin on emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in the pig. J. Appl. Microbiol. 98(3): 564-571.

Dickgieber, U., Weiss, N, Fritsche, D. 1984. *Lactobacillus gasseri* as the cause of septic urinary infection. Infection. 12: 14-16.

Dubernet, S., Desmasures, N. and Gueguen, M. 2002. A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level. FEMS. Microbiol. Lett. 214(2): 271-275.

Donabedian, S.M., Thal, L.A., Hershberger, E., Perri, M.B., Chow, J.W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F. and Zervos, M.J. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. J. Clin. Microbiol. 41(3): 1109-1113.

Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(5): 1434.

EFSA. 2005. Opinion of the Scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The EFSA Journal. 223:1-12.

Eaton, T.J. and Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 67(4): 1628-1635.

European commission, 2003. On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production: a working paper open for comment. Health and consumer protection directorate-general, Directorate C-Scientific opinions, C2-Management of scientific committees; scientific co-operation and networks.

Ferain, T., Hobbs, J.N., Jr., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N.E. and Delcour, J. 1996. Knockout of the two ldh genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 178(18): 5431-5437.

Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. and Rood,J.I. (2000) Gram-Positive Pathogens. Washington, DC: American Society for Microbiology. 268.

Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Raibaud, P., Ducluzeau, R. and Maguin, E. 1997. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. Plasmid. 37(3): 199-203.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety? Int. J. Food. Microbiol. 47(1-2): 1-24.

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G. and Swings, J. 2003. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. 69(2): 1270-1275.

Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. and Cutting, S.M. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl. Environ. Microbiol. 65(9): 4288-4291.

Guarner, F. and Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. Int. J. Food. Microbiol. 39(3): 237-238.

Hamilton-Miller, J.M., Shah, S. and Winkler, J.T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. Public. Health. Nutr. 2(2): 223-229.

Hoa, N.T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P.H., Ammendola, S., Ricca, E. and Cutting, A.S. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl. Environ. Microbiol. 66(12): 5241-5247.

Hong, H.A., Duc le, H. and Cutting, S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS. Microbiol. Rev. 29(4): 813-835.

Huys, G., D'Haene, K., Danielsen, M., Matto, J., Egervarn, M. and Vandamme, P. 2008. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. J. Food. Prot. 71(2): 339-344.

Huys, G., D'Haene, K. and Swings, J. 2006. Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. Antimicrob. Agents. Chemother. 50(4): 1550-1551.

ISO-6579. 1993 : Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella*.

ISO-7251.1993 : Microbiology general guidance for enumeration of presumptive *Escherichia coli* most probable number technique.

ISO-7932. 1993 : Microbiology general guidance for the enumeration of *Bacillus cereus*-Colony-count Technique at 30ºC.

ISO-15214. 1998 : Microbiology food and amimal feeding stuffs-Horizontal method for the Enumeration of mesophilic Lactic acid bacteria Colony-count Technique at 30ºC.

Iwata, M., Mada, M. and Ishiwa, H. 1986. Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. Appl. Environ. Microbiol. 52(2): 392-393.

Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J. and Barrett, J.B. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. J. Clin. Microbiol. 42(8): 3558-3565.

Jayamanne, V.S. and Adams, M.R. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. Lett .Appl. Microbiol. 42(3): 189-194.

Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. and Meile, L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. Syst. Appl. Microbiol. 29(2): 145-155.

Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. J. Clin. Microbiol. 37(11): 3497-3503.

Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D. and Chenchik, A. 1994. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. Biotechniques. 16(6): 1134-1137.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob. Chemother. 59(5): 900-912.

Klein, G., Pack, A. and Reuter, G. 1998. Antibiotic resistance patterns of *Enterococci* and occurrence of vancomycin-resistant *Enterococci* in raw minced beef and pork in Germany. Appl. Environ. Microbiol. 64(5): 1825-1830.

Kritas, S.K., Govaris, A., Christodoulopoulos, G. and Burriel, A.R. 2006. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 53(4): 170-173.

Kuhn, I., Burman, L.G., Haeggman, S., Tullus, K. and Murray, B.E. 1995. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of

DNA for epidemiological typing of *Enterococci*. J. Clin. Microbiol. 33(11): 2812-2817.

Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. J. Clin. Microbiol. 37(11): 3497-3503.

Kwon, H.S., Yang, E.H., Yeon, S.W., Kang, B.H. and Kim, T.Y. 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(2): 267-275.

Lai, M.H. and Kirsch, D.R. 1996. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the *vanA* gene cluster in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 40(7): 1645-1648.

Landman, D. and Quale, J.M. 1997. Management of infections due to resistant *Enterococci*: a review of therapeutic options. J. Antimicrob. Chemother. 40(2): 161-170.

Levanova, G.F., Lazovskaia, A.L. and Kashnikov, S. 2007. [Plasmid analysis of bacteria of *Bacillus* genus used in the development of probiotics]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.(5): 77-79.

Lin, C.F., Fung, Z.F., Wu, C.L. and Chung, T.C. 1996. Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from *Lactobacillus reuteri* G4. Plasmid. 36(2): 116-124.

Lin, W.H., Hwang, C.F., Chen, L.W. and Tsen, H.Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food. Microbiol. 23(1): 74-81.

Lund, B. and Edlund, C. 2001. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. Clin. Infect. Dis. 32(9): 1384-1385.

Macfarlane, G.T. and Cummings, J.H. 2002. Probiotics, infection and immunity. Curr. Opin. Infect. Dis. 15(5): 501-506.

Mater, D.D., Langella, P., Corthier, G. and Flores, M.J. 2008. A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. J Mol Microbiol Biotechnol. 14(1-3): 123-127.

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): 1-12.

Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3(1): 46-65.

Murray, B.E. and Mederski-Samaroj, B. 1983. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. J. Clin. Invest. 72(3): 1168-1171.

NCCLS. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th informational supplement (aerobic dilution). M100-S9. Wayne, PA:National committee for clinical laboratory standart.

Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Asada, K., Kato, I., Fujino, K. and Sato, T. 1994. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60(2): 637-640.

Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.M., Ali-Vehmas, T., Seppala, A., Priha, O. and Salkinoja-Salonen, M. 2007. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. Vet. Microbiol. 124(3-4): 329-339.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. and Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl. Microbiol. 100(6): 1171-1185.

Patel, R. 2000. *Enterococcal*-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. FEMS. Microbiol. Lett. 185(1): 1-7.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 1993. gram-positive bacteria. In : Microbiology. Oxford. 454-458.

Rao, S., Maddox, C.W., Hoien-Dalen, P., Lanka, S. and Weigel, R.M. 2008. Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. J. Clin. Microbiol. 46(3): 916-920.

Reid, G. 2005. The importance of guidelines in the development and application of probiotics. Curr. Pharm. Des. 11(1): 11-16.

Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr. 130(2S Suppl): 396S-402S.

Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. J. Appl. Microbiol. 98(6): 1410-1417.

Rubinstein, I. and Pedersen, G.W. 2002. *Bacillus* species are present in chewing tobacco sold in the United States and evoke plasma exudation from the oral mucosa. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9(5): 1057-1060.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84(3): 197-215.

SCAN. 2000. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on product BioPlus 2B® for use as feed additive. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General.

SCAN. 2001. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on product Toyocerin® for use as feed additive. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General.

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.

Scott, K.P., Melville, C.M., Barbosa, T.M. and Flint, H.J. 2000. Occurrence of the new tetracycline resistance gene *tet(W)* in bacteria from the human gut. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(3): 775-777.

Singer, D.A., Jochimsen, E.M., Gielerak, P. and Jarvis, W.R. 1996. Pseudo-outbreak of *Enterococcus durans* infections and colonization associated with introduction of an automated identification system software update. J. Clin. Microbiol. 34(11): 2685-2687.

Sorokulova, I.B., Osipova, I.G., Tereshkina, N.V., Vasil'eva, E.A. and Budanova, E.V. 2006. [A study of the safety of probiotic *Bacilli*]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.(1): 50-54.

Sul, S.Y., Kim, H.J., Kim, T.W. and Kim, H.Y. 2007. Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using multiplex PCR. J. Microbiol. Biotechnol. 17(3): 490-495.

Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. and Wondrack, L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob. Agents. Chemother. 40(11): 2562-2566.

Tannock, G.W. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Curr. Issues. Mol. Biol. 1(1-2): 53-64.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food. Microbiol. 81(1): 1-10.

Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D., Francke, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J. and Smid, E.J. 2006. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. J. Biol. Chem. 281(52): 40041-40048.

Trafalska, E. and Grzybowska, K. 2004. [Probiotics--an alternative for antibiotics?]. Wiad. Lek. 57(9-10): 491-498.

Tynkkynen, S., Singh, K.V. and Varmanen, P. 1998. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. Int. J. Food. Microbiol. 41(3): 195-204.

U.S. FDA. 2002. FDA's Office of Food Additive Safety. Food Safety Magazine. 32:17-21.

Vescovo, M., Morelli, L. and Bottazzi, V. 1982. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol. 43(1): 50-56.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M. and Ouwehand, A.C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Res. Microbiol. 156(2): 238-244.

von Wright, A. 2005. Regulating the safety of probiotics--the European approach. Curr Pharm. Des. 11(1): 17-23.

Wagner, R.D. and Cerniglia, C.E. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of competitive exclusion bacteria applied to newly hatched chickens. Int. J. Food. Microbiol. 102(3): 349-353.

Wang, T.T. and Lee, B.H. 1997. Plasmids in *Lactobacillus*. Crit. Rev. Biotechnol. 17(3): 227-272.

Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M. and Bager, F. 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. Emerg. Infect. Dis. 5(3): 329-335.

Werner, G., Willems, R.J., Hildebrandt, B., Klare, I. and Witte, W. 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. 41(4): 1499-1506.

Woodford, N., Johnson, A.P., Morrison, D. and Speller, D.C. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8(4): 585-615.

Wu, X.Y., Walker, M.J., Hornitzky, M. and Chin, J. 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. J. Microbiol. Methods. 64(1): 107-119.

Yeung, P.S., Sanders, M.E., Kitts, C.L., Cano, R. and Tong, P.S. 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains. J. Dairy. Sci. 85(5): 1039-1051.

Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H. and Reid, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* Species by Molecular Typing. Appl. Environ. Microbiol. 64(7): 2418-2423.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Lactobacillus*

1.1 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*

1.2 ระบุ 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 monocytogenes*
6. *L. casei*
7. *L. plantarum*
8. *L. brevis*
9. *L. fermentum* (not *L. fermenti*, now also include *L. cellobiosuss*)
10. *Listeria monocytogenes*; *Listerella*
11. *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *E. insidiosa*
12. *Arachnia propionica*; *Actinomyces propionicus*
13. *Arcanobacterium haemolyticum*; *Corynebacterium haemolyticum*
14. *Actinomyces* spp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **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	-	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	-	+	+	+	+	-	-	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	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

สัญลักษณ์ของการอ่านผลการทดสอบ

+ 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.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ยาปฏิชีวนะตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้นตั้งต้น (mg/ml)
ampicillin	DW; filter-sterile	100
chloramphenicol	95% ethanol	25
ciprofloxacin	0.1M NaOH; DW	50
erythromycin	95% ethanol	50
gentamicin	DW; filter-sterile	40
kanamycin	DW; filter-sterile	35
neomycin	DW; filter-sterile	100
rifampicin	methanol	25
streptomycin	DW; filter-sterile	50
tetracycline	70% ethanol	10
trimethoprim	dimethylacetamide	100
vancomycin	DW; filter-sterile	10

4. ผลการตรวจระบุเชื้อ *Bacillus* ด้วยวิธีทางชีวเคมีและวิธี ARDRA (*n*= 114)

วิธีชีวเคมี	วิธี ARDRA
B. subtilis (*n*= 54)	*B. subtilis* (22/54), *B. subtilis* cluster (32/54)
B. licheniformis (*n*= 29)	*B. licheniformis* (19/29), *B. subtilis* (4/29), *B. subtilis* cluster (6/29)
B. pumilus (*n*= 8)	*B. subtilis* cluster (8/8)
B. mycoides (*n*= 4)	*B. subtilis* cluster (3/4), *B. licheniformis* (1/4)
B. lentus (*n*= 4)	*B. licheniformis*(1/4), *B. subtilis* cluster (3/4)
B. cereus (*n*= *10*)	*B. subtilis* (3/10), *B. cereus* (7/10)
B. amyloliquefaciens (*n*= 5)	*B. subtilis* cluster (5/5)

5. ผลการตรวจระบุเชื้อ *Lactobacillus* ด้วยวิธีทางชีวเคมีและวิธี multiplex PCR (*n*= 97)

วิธีชีวเคมี	วิธี multiplex PCR
L. acidoplilus (*n*= 42)	*L. plantarum* (22/42), *L. gasseri* (7/42)
	L. rhamnosus (13/42)
L. delbrueckii (*n*= 29)	*L. delbrueckii* (15/29), *L. rhamnosus* (14/42)
L. casei (*n*= 10)	*L. casei* group (9/10), *L. plantarum* (1/10)
L. plantarum (*n*= 16)	*L. plantarum* (16/16)

6. 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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Peptone Saline Diluting fluid (PSD)

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

7. 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*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

21. *Bacillus subtilis strain BN*
22. *Bacillus coagulan*
23. *Bacillus lentus*
24. *Bacillus lichenifermis*
25. *Bacillus pumilus*
26. *Bacillus subtilis* สเตรนที่ไม่สร้างยาปฏิชีวนะ
27. *Bacillus toyoi*
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*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว เวชสิริ วรรณประสาท เกิดเมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์มหาบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย