การใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในการป้องกันการท้องเสียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดในลูกสุกรระยะดูดนม

Viphavanh Chanthavong

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2567

การใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในการป้องกันการท้องเสียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดในลูกสุกรระยะดูดนม

Viphavanh Chanthavong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในการป้องกันการท้องเสียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดในลูกสุกรระยะดูดนม

Viphavanh Chanthavong

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.กฤดา ชูเกียรติศิริ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.พชรพร ตาดี)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.วรางคณา ไชยซาววงษ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิติญา วงษ์คำจันทร์ โอราน)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัวเรียม มณีวรรณ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยศ สัมฤทธิ์สกุล)
รักษาการแทนรองอธิการบดี
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในการป้องกันการท้องเสียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดในลูกสุกรระยะดูดนม

ชื่อผู้เขียน Mrs. Viphavanh Chanthavong

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.กฤดา ชูเกียรติศิริ

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการใช้แบคเทอริโอเฟจ (เฟจ) เพื่อป้องกันโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในลูกสุกรระยะดูดนม จากผลการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 50 isolates ที่แยกได้จากลูกสุกรระยะดูดนมที่ท้องเสียแสดงการดื้อต่อยา amoxicillin 100%, oxytetracycline และ neomycin 94%, sulfamethoxazole-trimethoprim 70%, gentamicin 56%, cephalexin 54%, enrofloxacin 42% และ colistin 28% นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* จำนวนหนึ่งสายพันธุ์มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิดโดยคิดเป็น 100% คือ VC22 จากการทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้อ แบคเทอริโอเฟจ WPEC2 แสดงให้เห็นประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาหลายชนิดได้มากกว่า 64% ตามมาด้วยแบคเทอริโอเฟจ WPEC3, WPEC4, WPEC5 และ WPEC1 โดยคิดเป็น 60 54 48 และ 46% ตามลำดับ หลังจากผสมเป็นสารผสมแบคเทอริโอเฟจ สารผสมดังกล่าวสามารถลดเชื้อ *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวแทนการดื้อยาปฏิชีวนะได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากมีการใช้แบคเทอริโอเฟจ ($p<0.05$) การให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจครั้งเดียว (10^9 PFU/mL) สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของลูกสุกรระยะดูดนมลงได้ 1.33 log-units ในวันที่ 7 ($p<0.05$) นอกจากนี้คะแนนอุจจาระของกลุ่มที่ได้รับแบคเทอริโอเฟจยังต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม body weight gain (BWG) และ average daily gain (ADG) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งสองกลุ่ม ($p>0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารผสมแบคเทอริโอเฟจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกทดแทนยาปฏิชีวนะในการจัดการเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสุกรและลดอัตราการตายในลูกสุกรระยะดูดนมได้

คำสำคัญ : แบคเทอริโอเฟจ; E. coli; การดื้อยาปฏิชีวนะ; สุกรระยะดูดนม

Title USED OF BACTERIOPHAGE COCKTAIL FOR PROTECTING DIARRHEA CAUSED BY MULTIDRUG-RESISTANT *Escherichia coli* IN SUCKLING PIGLETS

Author Mrs. Viphavanh Chanthavong

Degree Master of Science in Animal Science

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Kridda Chukiatsiri

ABSTRACT

This study used bacteriophages (phages) to prevent antibiotic-resistant *E. coli*-caused disease in suckling piglets. The results of the disk diffusion assay showed that fifty *E. coli* isolated from diarrheal suckling pigs showed 100% resistance to amoxicillin, 94% to oxytetracycline and neomycin, 70% to sulfamethoxazole-trimethoprim, 56% to gentamicin, 54% to cephalexin, 42% to enrofloxacin, and 28% to colistin. Additionally, only one strain of *E. coli* was 100% resistant to eight different types of antibiotics, namely VC22. From the phage lytic ability test, bacteriophage WPEC2 showed the most effectiveness by eliminating multidrug-resistance (MDR) *E. coli* isolates up to 64%, followed by WPEC3, WPEC4, WPEC5, and WPEC1 at 60, 54, 48, and 46%, respectively. After formulation as a bacteriophage cocktail, it significantly reduced the counts of five representative *E. coli* strains at 6 to 24 h post-phage treatment ($p < 0.05$). A single dose of the phage cocktail (10^9 log PFU/mL) could reduce the number of *E. coli* present in the gastrointestinal tract of suckling piglets by showing 1.33 log-units reduction on days 7 ($p<0.05$). In addition, the fecal score of the phage treatment group was lower than that of the control group ($p<0.05$). However, body weight gain (BWG) and average daily gain (ADG) were not significantly different in both groups ($p>0.05$). These findings suggest that a developed bacteriophage cocktail can be used as an alternative to antibiotics to manage pathogenic *E. coli* in the gastrointestinal system of pigs and reduce the chance of mortality in suckling piglets.

Keywords : Bacteriophage; E. coli; Antibiotic Resistance; Suckling Piglets

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษา คำแนะนำช่วยเหลือเป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.กฤดา ชูเกียรติศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.พชรพร ตาดี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. วรางคณา ไชยซาววงษ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.กิติญา วงษ์คำจันทร์ โอราน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และขอขอบคุณ ดร. วัฒนา เปลยันทะ ที่กรุณาให้การสนับสนุน ให้ความเอาใจใส่เป็นอย่างดีและให้คำปรึกษาในการดำเนินวิจัย การแก้ปัญหาระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี ขอขอบคุณคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พร้อมทั้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณกรมความร่วมมือระหว่างประเทศ TICA (Thailand International Cooperation Agency) ที่ให้ทุนการศึกษาตลอดระยะเวลาสองปีรวมทั้งให้ทุนการทำวิจัยครั้งนี้

นอกจากนี้ขอขอบคุณครอบครัวเป็นอย่างสูงที่คอยส่งกำลังใจให้มาโดยตลอด และขอบคุณ นางสาว ณัฏฐา วิกาศ ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัย ให้คำแนะนำช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

Viphavanh Chanthavong

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

ขอบเขตการศึกษา 2

สมมติฐานงานวิจัย 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

อุตสาหกรรมการผลิตและการส่งออกสุกร 3

ปัจจัยโน้มนำและแนวทางการควบคุมโรคภายในฟาร์มสุกร 3

โรคท้องเสียในสุกร 4

กลไกการเกิดโรคติดเชื้อ *E. coli* ในสุกร 7

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกร 9

การใช้ยาต้านจุลชีพและการรักษาทางเลือก 9

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) 10

ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ 10

โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ 11
การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ 12
การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในเซลล์แบคทีเรีย 14
กลไกการทำลายแบคทีเรีย 16
การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในการป้องกันและรักษาโรค 18
การใช้แบคเทอริโอเฟจในสัตว์ทดลอง 19
การเปรียบเทียบประสิทธิผลของการใช้แบคเทอริโอเฟจกับยาต้านจุลชีพ 20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 21
เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 21
การเตรียมแบคเทอริโอเฟจ 21
การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 22
การศึกษาช่วงกว้างในการยับยั้งของแบคเทอริโอเฟจ (Host-range determination) 23
การเตรียมสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage cocktail) และการทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง 23
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการป้องกันเชื้อ *E. coli* 23
การประเมินคะแนนมูลสุกร (Fecal score) 25
การศึกษาสมรรถภาพการเจริญเติบโต 25
การวิเคราะห์ทางสถิติ 26
สถานที่ดำเนินงาน 26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 27
การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 27
การศึกษาช่วงกว้างในการยับยั้งของแบคเทอริโอเฟจ (Host-range determination) 29
การศึกษาสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (phage cocktail) ต่อเชื้อ *E. coli* ในระดับหลอดทดลอง *(in vitro)* 31

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการป้องกันเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกร *(in vivo)* ... 34
การประเมินคะแนนมูลสุกร (Fecal score) ... 36
การศึกษาสมรรถภาพการเจริญเติบโต ... 37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ ... 39
บรรณานุกรม ... 40
ประวัติผู้วิจัย ... 64

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณการผลิต การส่งออก และการบริโภคสุกรภายในประเทศไทย (ปี 2561-2565).... 3

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli* 7

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจและยาต้านจุลชีพ 20

ตารางที่ 4 มาตรฐานเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 22

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* (log CFU/mL)..... 36

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อลักษณะมูลในลูกสุกรที่อายุ 7-14 วัน 37

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการเจริญเติบโตในลูกสุกรที่อายุ 7-14 วัน..... 38

ตารางที่ 8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดต่อเชื้อ E. coli 57

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจจำแนกตามความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli*..... 61

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนการดื้อยาปฏิชีวนะ 63

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 กลไกการเกิดโรคท้องเสียในลูกสุกร 8

ภาพที่ 2 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ 12

ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ 14

ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ 15

ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจ 17

ภาพที่ 6 แผนที่การเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ในช่วงปี พ.ศ 2563-2565 21

ภาพที่ 7 การให้คะแนนอุจจาระของสุกร 25

ภาพที่ 8 กราฟการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดของเชื้อ *E. coli* 28

ภาพที่ 9 การทดสอบแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียด้วยวิธี spot test 30

ภาพที่ 10 กราฟประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* isolates ต่างๆ 30

ภาพที่ 11 กราฟประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการทำลายเชื้อ *E. coli* isolates ต่างๆ 31

ภาพที่ 12 กราฟประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (A, B, C และ D) และสายพันธุ์อ้างอิง ATCC 25922 (E) 34

ภาพที่ 13 การเตรียมเชื้อ *E. coli* 51

ภาพที่ 14 การทดสอบยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *E. coli* 51

ภาพที่ 15 การปรับความขุ่น 0.5 McFarland ด้วยวิธี manual 52

ภาพที่ 16 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจ (host-range) 52

ภาพที่ 17 การทดสอบ bacteriophage cocktail ในหลอดทดลอง 53

ภาพที่ 18 การทดสอบ bacteriophage cocktail ในหลอดทดลองทุก 6 ชั่วโมง 53

ภาพที่ 19 การทำเครื่องหมายลูกสุกร 54

ภาพที่ 20 การป้อน PBS และ bacteriophage cocktail ให้ลูกสุกร 54

ภาพที่ 21 การชั่งน้ำหนักลูกสุกร 55
ภาพที่ 22 การ swab ทวารของลูกสุกร..... 55
ภาพที่ 23 การ dilute ตัวอย่าง..... 56
ภาพที่ 24 เทคนิคการ pour plate..... 56

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเลี้ยงสุกรเป็นอาชีพที่สร้างรายได้ที่สำคัญของเกษตรกรไทย ในปี 2565 ประเทศไทยได้มีการผลิตสุกร 15.51 ล้านตัว มีความต้องการบริโภคเนื้อสุกร 1.15 ล้านตัน มีการส่งออกเนื้อสุกรแช่เย็นแช่แข็งปริมาณ 728 ตัน ได้ส่งออกสุกรพันธุ์และสุกรมีชีวิตปริมาณ 2,959 ตัว คาดว่าในปี 2566 จะมีแนวโน้มการผลิตสุกรเพิ่มขึ้นจากปี 2565 ร้อยละ 12.66 แต่เกษตรกรพบความเสี่ยงของโรคที่เกิดในสุกรทำให้มีความกังวล ทั้งยังมีต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นจากค่าใช้จ่ายทางด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ซึ่งปัจจัยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคระบาดในสุกรได้แก่ โรคท้องร่วงติดต่อในสุกร (Porcine epidemic diarrhea: PED) และโรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ (Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS) และโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever: ASF) เป็นต้น (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ, 2565) โรคท้องเสียเป็นปัญหาที่พบในลูกสุกรทุกแหล่ง พบว่าประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* การรักษาส่วนใหญ่จะให้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดจำนวนเชื้อที่อยู่ในลำไส้ (สุกิจ, 2551) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ทำให้เกิดสารตกค้างทำให้เกิดเชื้อดื้อยา และยังส่งผลมายังผู้บริโภคได้ โดยการบริโภคเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (ใจพร, 2561; ณัฐธิดา และคณะ, 2559)

จากปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น ช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาทางสหภาพยุโรปได้ประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะทุกชนิดในการเลี้ยงสัตว์ จึงได้มีการเปลี่ยนมาใช้สารทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีความปลอดภัยมากขึ้นเช่น กรดอินทรีย์ ซิงค์ออกไซด์ เอนไซม์ สมุนไพร สารเสริมชีวนะ (probiotic) และสารส่งเสริมชีวนะ (prebiotic) (วรรณพร, 2557) นอกจากนี้การใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรค colibacillosis ในทางเดินอาหารสุกร เป็นแนวทางการรักษาทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในสถานการณ์การพัฒนาของเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นในปัจจุบันได้ เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจ สามารถควบคุมหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเท่านั้นและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (Gaborieau and Debarbieux, 2023; Sulakvelidze et al., 2001; เตชภณ, 2564) ทั้งยังสามารถลดเชื้อ *E. coli* (Han et al., 2016; Imklin et al., 2022; Kim et al., 2014) โดยเฉพาะการใช้สารผสมของแบคเทอริโอเฟจจะช่วยลดเชื้อ *E. coli* ได้ดี (Jamalludeen et al., 2009) การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจกับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) จะปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปภายในเซลล์ จากนั้นจะใช้กลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์เพื่อการเพิ่มจำนวนเรียกว่า lytic cycle bacteriophage ทุกชนิดทำให้เซลล์แตกโดยการทำลาย

peptidoglycan ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยเสริมความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ทนทานต่อแรงดันภายในเซลล์และทำให้เซลล์แตกในที่สุด (ปริชาติ, 2562) จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีความนิยมใช้แบคเทอริโอเฟจเพิ่มมากขึ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอเฟจต่อการป้องกันโรคท้องเสียในสุกร เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรที่มีคุณภาพและผลิตภัณฑ์จากผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากสุกรที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากสุกรที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกร
3. ลดการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดสารตกค้างในสุกร

ขอบเขตการศึกษา

- ทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *E. coli* จำนวน 50 isolates ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย
- ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากสุกรที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
- ทำการทดสอบแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกรที่เลี้ยงในฟาร์ม

สมมติฐานงานวิจัย

การใช้แบคเทอริโอเฟจสามารถยับยั้งและลดการติดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกรได้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

อุตสาหกรรมการผลิตและการส่งออกสุกร

การเลี้ยงผลิตและการส่งออกสุกรมีความสำคัญเป็นอย่างมากทางเศษฐกิจ เนื้อสุกรถือได้ว่าเป็นแหล่งโปรตีนหลักของประชากรโลกจึงทำให้มีความต้องการเนื้อสุกรในตลาดสูง ดังนั้นการเลี้ยงสุกร จึงต้องมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเลี้ยงสุกรจากการเลี้ยงแบบฟาร์มรายย่อยเป็นฟาร์มขนาดกลางคลอบคลุมไปถึงฟาร์มขนาดใหญ่และเลี้ยงแบบครบวงจรมากขึ้นเพื่อการบริโภคเองภายในประเทศหรือการค้าขายส่งออก ซึ่งถือเป็นช่องทางสำคัญในการกระตุ้นระบบเศรษฐกิจของประเทศเป็นไปตามความต้องการของผู้บริโภค

ตารางที่ 1 ปริมาณการผลิต การส่งออก และการบริโภคสุกรภายในประเทศไทย (ปี 2561-2565)

รายการ	**ช่วงปี 2561-2565**	**แนวโน้มปี 2566**
ปริมาณการผลิต (ล้านตัว)	15.51	12.66%
ปริมาณการบริโภค (ล้านตัน)	1.15	12.58%
ปริมาณการส่งออก		
เนื้อสุกรแช่แข็ง (ตัน)	728	
เนื้อสุกรแปรรูป (ตัน)	4,957	เพิ่มขึ้นเล็กน้อย
สุกรมีชีวิต (ตัว)	2,959	

ที่มา: สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ (2565)

ปัจจัยโน้มนำและแนวทางการควบคุมโรคภายในฟาร์มสุกร

เชื้อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ได้ทางตรงและทางอ้อม โดยมีแหล่งที่มาจากการติดเชื้อจากการสัมผัสกับสุกรที่ป่วย การสัมผัสกับวัสดุหรืออุปกรณ์ภายในฟาร์มที่มีเชื้อโรคปะปนอยู่ การสัมผัสกับสุกรที่เป็นตัวนำโรค (carrier หรือ reservoir) เมื่อสัตว์ติดโรคจะไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการป่วยเล็กน้อยแต่มีการกักเก็บเชื้อแล้วมีการแพร่เชื้อออกมาในช่วงที่ร่างกายอ่อนแอทำให้สุกรที่เลี้ยงรวมกันเกิดการติดเชื้อตามมาได้ ทั้งยังมีแหล่งการติดเชื้อจากดิน การติดเชื้อจากอาหารและน้ำที่มีเชื้อโรคปะปน และการติดเชื้อจากเชื้อโรคที่มีอยู่แล้วในร่างกายเช่นเมื่อร่างกายอ่อนแอเชื้อโรคจะเพิ่มมากขึ้นทำให้สุกรเกิดอาการป่วยได้ ซึ่งการควบคุมและป้องกันโรคจึงเป็นส่วนที่สำคัญมากในด้านการจัดการ เนื่องจากในปัจจุบันโรคสุกรจะเป็นลักษณะการติดเชื้อแบบแฝง (latent infection or

persistent infection) และเกิดการติดเชื้อผสม (mixed infection) หลายชนิดร่วมกันทำให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial) ในการรักษาและควบคุมโรค นอกจากนี้ยังมีการใช้วัคซีนในการป้องกันโรคอย่างแพร่หลาย ด้วยเหตุนี้ความรู้และเทคโนโลยีที่ใช้ในการควบคุมและป้องกันโรค ด้านการจัดการรวมถึงควบคุมหรือเพิ่มผลลิตจึงมีการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องและเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ (กิจจา และคณะ, 2537)

โรคท้องเสียในสุกร

โรคท้องเสียเป็นโรคติดเชื้อทำให้ลูกสุกรระยะดูดนมป่วย และตายมากที่สุดเมื่อเทียบกับโรคอื่นๆ พบว่า 48% ของโรคที่ติดเชื้ออาการท้องเสียมี *Escherichia coli* เป็นสาเหตุ เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง มีความยาว 2-3 ไมครอน กว้างประมาณ 0.6 ไมครอน เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและเจริญได้บ้างในที่ที่ไม่มีออกซิเจน เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบต่างๆ นอกเหนือจากระบบทางเดินอาหาร (Extraintestinal strains of *E. coli*) และสายพันธุ์ที่ก่อโรคโดยตรงในระบบทางเดินอาหาร (Enteropathogenic strains of *E. coli*) สามารถเกาะติดกับผนังเซลล์ของโฮสต์และ ปล่อย toxin ที่เป็นอันตรายต่อเยื่อบุลำไส้ ซึ่งจะเกิดกับลูกสุกร 3 ช่วงอายุคือลูกสุกรแรกคลอดจนถึง 7 วัน ช่วงอายุระหว่าง 2-3 สัปดาห์และ 1-2 สัปดาห์หลังหย่านมที่เกิดจากปัญหาการจัดการฟาร์มแม่สุกร ช่วงก่อนคลอดและหลังคลอดไม่ดีการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ เช่นอุณหภูมิและความชื้นจะเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อของลูกสุกร ทั้งนี้ยังพบว่าถ้าอุณหภูมิของคอกต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส จะทำให้ลูกสุกรท้องเสียได้ เพราะการบีบตัวของลำไส้ลดลงและเพิ่มจำนวนเชื้อ *E. coli* มากขึ้น ลูกสุกรที่ติดเชื้อจะแสดงอาการซึม อ่อนเพลีย นอนรวมกันและถ่ายเหลวบ่อย มีสีเหลืองอาจตายได้ภายใน 2-6 วัน เพราะร่างกายขาดน้ำและปรับตัวไม่ทัน ตาจมลึก อุจจาระติดบริเวณก้น ลูกสุกรที่เป็นโรคแบบเรื้อรังจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง (กิจจา และคณะ, 2537)

โรคที่เกิดจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ก่อโรคเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้แบ่งกลุ่มสายพันธุ์ที่ก่อโรคตามประเภทของสารพิษและลักษณะการก่อโรคได้เป็น 6 ประเภทตามการรายงานของ อรุณ และคณะ (2563) ดังนี้

1. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) เป็นสายพันธุ์ผลิตสารพิษ verotoxin ที่คล้ายกับ Shigatoxin ที่สร้างจาก *Shigella dysenteriae* โดย serotype ที่พบการก่อโรคได้บ่อย คือ EHEC O157:H7 ถ้ามีการได้รับเชื้อจากอาหารปนเปื้อน serotype O157:H7 จะทำให้เกิดโรคภาวะท้องเสียอย่างรุนแรงมีเลือดออก (hemorrhagic) ในลำไส้ถ่ายออกมามีมูกเลือดและไตวายได้

ปริมาณของ serotype O157:H7 ที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10-100 เซลล์ขณะที่ EHEC serotype อื่นมีปริมาณที่ก่อให้เกิดโรคสูงกว่าโดยทั่วไปเชื้อจะมีระยะฟักตัว 3-4 วัน เชื้อมีการปนเปื้อนในแหล่งอาหารเช่น เนื้อสัตว์ดิบ ไส้กรอกดิบ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

2. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษจะไม่ทนความร้อน สามารถทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ โดยมีการแสดงอาการทั่วไปคือ ไข้ต่ำ ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ และ อ่อนเพลีย เมื่อร่างกายได้รับเชื้อเข้าไปประมาณ 100 ล้านเซลล์ถึง 10 พันล้านเซลล์จะแสดงอาการออกมา แหล่งที่พบเชื้อจะอยู่ในน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อแพร่กระจายในอาหารหรือสัมผัสจากสัตว์ป่วย

3. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) เป็น *E. coli* เป็นชนิดที่ระบาดโดยมีความรุนแรงและถือว่าเป็นเชื้อโรคที่ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขับสารพิษทั่วไปของ EEC ชนิดอื่น EPEC เชื้อกระจายไปในคนทำให้อุจจาระร่วงมักในเด็กถ่ายเป็นน้ำหรือเป็นเลือดและมีการเกิดขึ้นในสัตว์หลายชนิด เช่น หมู วัวและควาย อาการจะคล้ายกันกับที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* ที่เรียกว่า ชิกะทอกซิน (shigatoxin) เช่นกัน อาหารที่มีการพบเชื้อนี้คือเนื้อสัตว์และจากน้ำปนเปื้อน และหากเด็กเกิดการติดเชื้อนี้อาจจะทำให้เกิดการภาวะขาดน้ำและอัตราการเสียชีวิตอาจสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

4. Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) เป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดแผลแต่เชื้อไม่สร้างสารพิษ ส่วนใหญ่พบเป็นสาหตุของโรคท้องเสียสาเหตุของโรคเกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำปนเปื้อนเชื้อ

5. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) ชนิดก่อโรคที่พบเฉพาะในคนเท่านั้น เชื้อนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสีย ในประเทศที่กำลังพัฒนาพบมากในเด็กมีอาการถ่ายเป็นน้ำหรือเป็นมูกมีไข้ต่ำ ในทารกและเด็กเล็กจะมีอาการท้องเสียแบบเรื้อรัง

6. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) เชื้อกลุ่มนี้พบในเด็กอายุตั้งแต่ 18 เดือน ถึง 5 ปี หรือในเด็กที่อายุมากกว่านี้ ซึ่งผู้ใหญ่เป็นพาหะนำเชื้อจะมีอาการท้องเสียเรื้อรังเนื่องจากลำไส้อักเสบ ผู้ป่วยอาจมีอาการหนัก เชื้อกลุ่มนี้ไม่ผลิต enterotoxin และ shigatoxin

ในสุกรจะพบเชื้อ *E. coli* จำนวนมากในลำไส้ใหญ่แต่ในลำไส้เล็กจะมีปริมาณน้อยมากประมาณ 10^3-10^4 cfu/g เมื่อสุกรเกิดการป่วยจะพบจำนวนเชื้อ *E. coli* ชนิด ETEC เพิ่มจำนวนเป็น 10^7-10^9 cfu/g ซึ่งมีผลมาจากสภาพแวดล้อม การจัดการและโรงเรือนเป็นผลทำให้เชื้อ *E. coli* เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในลำไส้เล็ก แต่การสร้าง toxin เรียกว่า enterotoxin ทำให้ร่างกายเกิดการสูญเสียน้ำ electrolyte ถูกขับออกมาเกินกว่าที่ลำไส้เล็กจะดูดซึมได้ จึงกลายเป็นอุจจาระไหลออกมา

เป็นสีเหลืองอ่อน จึงทำให้ลูกสุกรเกิดอาการกระหายน้ำเกิดกระบวนการเกิดอาการ ตามที่ วัลลภา (2550) ได้กล่าวดังต่อไปนี้

- เชื้อ *E. coli* ชนิด Enteropathogenic (ETEC) นี้สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ซึ่งจะพยายามขับสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายเมื่อเคลื่อนที่ผ่านระบบ peristalsis ของลำไส้แบคทีเรียจะใช้ส่วนของ pilli ที่อยู่รอบๆ ตัวจะทำการเกาะกับ villus/villi ของลำไส้และบน pilli ของพวก ETEC นี้จะมีปุ่มที่เรียกว่า adhesin หรือส่วนพิเศษที่ *E. coli* สายพันธุ์ธรรมดาไม่มี ส่วนนี้เองที่จะทำให้แบคทีเรียเกาะยึดแน่นกับผนังลำไส้โดยไม่ถูกขับออกไป
- เมื่อ *E. coli* (ETEC) ยึดเกาะผนังลำไส้ได้แล้ว (Colonization) ก็จะสามารถเพิ่มจำนวนโดยที่ไม่ก่อตัวเข้าไปในอวัยวะอื่นอย่างรวดเร็ว ลูกสุกรที่ท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* (ETEC) ทำให้มีการขับถ่ายเชื้อ *E. coli* ออกมาถึง 1 ล้านตัวต่ออุจจาระเหลว 1 ซีซี
- *E. coli* (ETEC) จำนวนมากนี้จะผลิต toxin ออกมาเรียกว่า enterotoxin หรือ exotoxin มี 2 ชนิดคือ heat stable (ST) enterotoxin และ heat labile (LT) enterotoxin ทั้งนี้ควบคุมโดย transmissible plasmid โดย enterotoxin ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบ cyclic adenosine monophosphate (CAMP) และ cyclic guanosine monophosphate (CGMP) ในร่างกาย
- Toxin เป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์มีอาการท้องเสียถ้ามีเชื้อ *E. coli* เกาะติดผนังลำไส้อย่างเดียวจะไม่ทำให้เกิดอาการเหล่านั้น

แม่โจ้ ๒๕๔๒ MAEJO UNIVERSITY

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli*

Pathotype	Adhesins	Toxins	O serogroups	Diseases
ETEC	F5 (K99), F6(K987P), F41,	Sta	O8, O9, O20, O64, O101	Neotar diarrhea
	F4(K88)	Sta, STb, LT, EAST1, a-hemolysins	O8, O138, O141, O145, O147 O149, O157	Neotar diarrhea Diarrhea in young pigs preweaning
	F4(K88), AIDA	Sta, STb, LT, EAST1, a-hemolysins	O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157, O?:K48	Post weaning diarrhea
	unknow			
	F18, AIDA	Sta, STb, LT, Stx(VT), EAST1, a-hemolysins	O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157	
EPEC	Eae (intimin)		O45, O103	
STEC (VTEC)	F18, AIDA	Stx2e(VT2e), EAST1, a-hemolysins	O138, O139, O141, O147,	Edema disease
	Eae (intimin)	Stx1 and/or Stx2	O157	None in pigs, bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome in humans
ExPEC	P, S	CNF	O6, O8, O9, O11, O15, O17, O18, O20, O45, O60, O78, O83, O93, O101, O112, O115, O116	Colisepticemia/polyserositis
	P, S	CNF	O1, O4, O6, O18	Urogenital infection

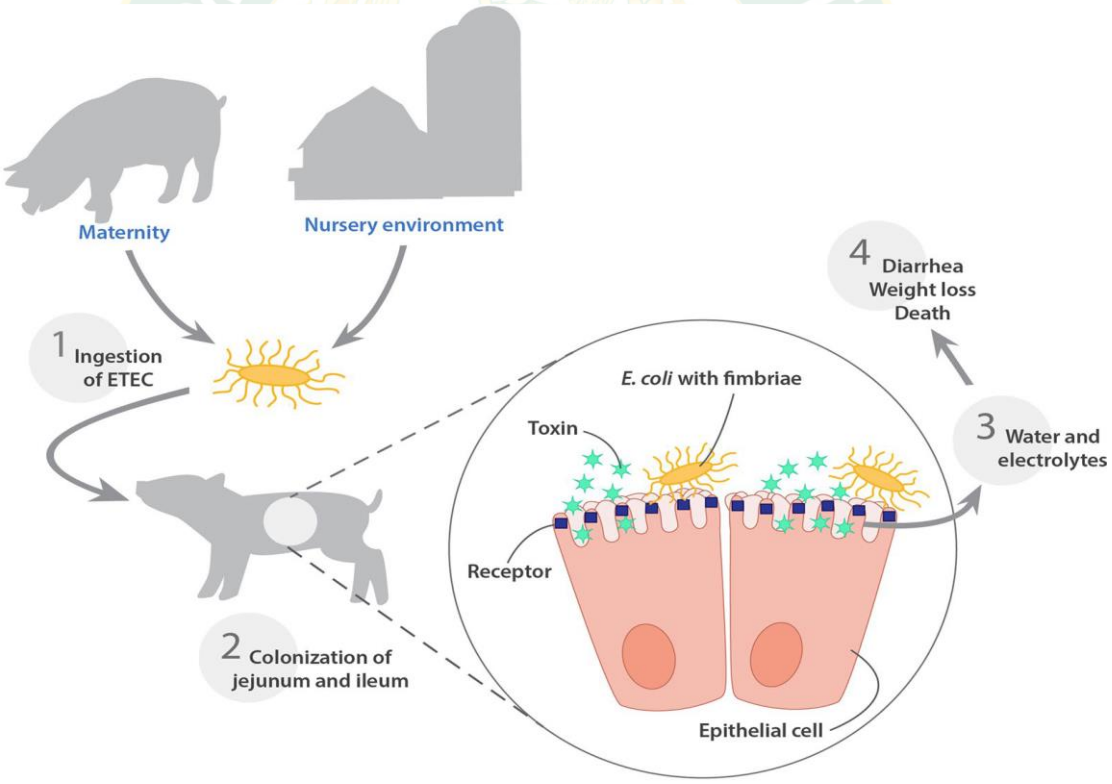
ที่มา: Jeffrey et al. (2019)

กลไกการเกิดโรคติดเชื้อ *E. coli* ในสุกร

การติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุก่อโรค colibacillosis ในระบบทางเดินอาหารของสุกรมักพบในลูกสุกรช่วงแรกเกิด (neonatal enteric colibacillosis) และหลังหย่านม (post-weaning enteric colibacillosis) เป็นสาเหตุที่ทำให้สุกรป่วยและเกิดการตายในลูกสุกรแรกเกิด (neonatal diarrhea) และหลังหย่านม (post-weaning diarrhea) ที่พบเห็นได้ทั่วโลก (Zimmerman et al., 2012) เมื่อสุกรได้รับเชื้อ *E. coli* จะเกิดอาการป่วยโดยเชื้อจะผ่านเข้าทางปากด้วยการกิน (oral transmission) เชื้อจะเข้าไปยึดเกาะบนผิวของเยื่อบุลำไส้ (microvilli) เชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (infected site) และสร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณลำไส้นั้นที่เกิดจากการทำลายเซลล์บุเยื่อเมือก โดยโมเลกุลของสารพิษที่เข้าจับกับตัวรับ

จำเพาะแล้วไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenyl cyclase ส่งผลให้การดูดซึมของลำไส้ลดลง แล้วเกิดปริมาณของเหลวละมีสิ่งคัดหลั่งเพิ่มมากขึ้นทำให้สุกรเกิดอาการท้องเสียและภาวะขาดน้ำ (dehydration) ตามมา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อและความรุนแรงของเชื้อรวมทั้งปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม (อุณหภูมิ ความชื้น การจัดการต่าง ๆ)

เมื่อสุกรติดเชื้อ *E. coli* จะเกิดอาการท้องเสียมีค่า pH เป็นด่าง อุจจาระเป็นน้ำอาจมีลักษณะใส หรือสีเหลือง ขึ้นอยู่กับชนิดและระยะเวลาที่ได้รับเชื้อบางครั้งมีอาการอาเจียนร่วมด้วยลูกสุกรแรกเกิดช่วงอายุ 0-4 วันแรกคลอดพบอาการท้องเสียแบบถ่ายเหลวมีสีเหลืองบ่อยครั้งในรายที่รุนแรงอาจพบภาวะอาเจียน (vomit) ร่วมด้วย ทำให้ร่างกายเกิดภาวะขาดน้ำและตายได้ พบได้ในลูกสุกรแรกเกิดจากสุกรสาว (gilt) มากกว่าสุกรนาง (sow) และพบน้อยลงเมื่อลูกสุกรมีอายุมากขึ้น เนื่องจากมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบเยื่อเมือก ทำให้อัตราการป่วยและอัตราการตายน้อยลง ในขณะที่ยังมีอาการท้องเสียจะมีการคายน้ำขึ้นเรื่อย ๆ ขนหยาบกร้าน อุณหภูมิร่างกายต่ำกว่าปกติ



ภาพที่ 1 กลไกการเกิดโรคท้องเสียในลูกสุกร

ที่มา : (Rhouma, 2017)

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารของสุกร

แนวทางการวินิจฉัยสามารถทำได้ด้วยการสังเกตอาการทางคลินิกเมื่อสุกรป่วยจะมีอาการซึม ไม่กินอาหาร ซูบผอมและพบรอยโรค ซึ่งอาการที่บ่งชี้การติดเชื้อ *E. coli* ได้แก่ลำไส้อักเสบ (enteritis) ต่อมน้ำเหลืองโตบริเวณลำไส้ที่เกิดการติดเชื้อ (mesenteric lymph nodes enlargement) โดยการเก็บตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อจากการ swab หรือลำไส้ของสุกร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่ใช้สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae เพื่อยืนยันสาเหตุที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีการจำแนกเชื้อออกเป็นหลายกลุ่มทำให้การแยกชนิดของ *E. coli* มีหลายวิธีเช่นการทดสอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของเชื้อผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) การวิเคราะห์ข้อมูลจำเพาะของเชื้อตัวอย่างเทียบกับข้อมูลลำดับยีนของเชื้อเฉพาะกลุ่มด้วยเครื่องมือ MALDI-TOF mass spectrometry เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการทดสอบ enterotoxins และ cytotoxins ทำการทดสอบด้วยเทคนิค enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) ที่มีความสำคัญกับขั้นตอนในการวินิจฉัยต่อไป (Jeffrey et al., 2019)

การใช้ยาต้านจุลชีพและการรักษาทางเลือก

เนื่องจากโรคในทางเดินอาหารสุกรคือโรคโคไลบาซิลโลซิสมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำให้สุกรเกิดอาการป่วยด้วยอาการท้องเสียสาเหตุหนึ่งที่สำคัญอาจอยู่ที่ระบบการจัดการการเลี้ยง โดยเฉพาะในบริเวณคอกคลอดให้มีจำนวนเชื้อน้อยที่สุดเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อจากแม่สุกรสู่ลูกสุกรหรือแพร่น้อยที่สุด เนื่องจากการพิจารณาความรุนแรงของโรคในสุกรแรกเกิดส่วนใหญ่ก่อให้เกิดความสูญเสียมากกว่าสุกรหลังหย่านม ดังนั้นแนวทางควบคุมและป้องกันโรคมีความจำเป็นโดยเป้าหมายหลักคือการลดปริมาณเชื้อก่อโรคในสิ่งแวดล้อมด้วยการจัดการระบบความปลอดภัยทางชีวภาพให้เหมาะสมมีการจัดการระดับภูมิคุ้มกันที่สูงเพียงพอด้วยการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันจากแม่สุกรผ่านทางนมน้ำเหลือง (lactogenic immunity) หรือการให้วัคซีนป้องกันโรคเพื่อลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแนวทางการป้องกัน (สุกิจ, 2551) และการควบคุมโรคท้องเสียที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียคือการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างถูกวิธี ซึ่งการใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial drugs) เป็นกลุ่มยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาและควบคุมโรคทั้งในรูปแบบการฉีด (injection) การผสมในอาหาร (feed medication) ละลายในน้ำ (water medication) รวมถึงการใช้ในรูปแบบของสารเติมแต่ง (feed additive) จะใช้ผสมกับอาหารสัตว์เพื่อช่วยรเร่งการเจริญเติบโตโดยการใช้จะต้องคำนึงถึงการออกฤทธิ์ของยา ขนาดและชนิดของยาที่ใช้ให้เหมาะสมจึงจะส่งผลให้เกิดแนวโน้มของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาตามมา ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ได้แก่ ampicillin, amoxycillin, apramycin, neomycin, tetracyclines, trimethoprim: sulphonamide, spectinomycin, furazolidone, halquinol

(quixalud, squibb) และสารอินทรีย์ (Taylor, 1986) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานหรือใช้เกินความจำเป็นทำให้ยาปฏิชีวนะใช้ไม่ได้ผล ซึ่งยากต่อการรักษา (World Health Organization, 2021) ทำให้เกิดความกังวลในการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นปัญหาสำคัญที่สุดในสัตวแพทย์ศาสตร์ เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดแบคทีเรียดื้อยา (Luppi et al., 2015) จึงเกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภคเนื้อสัตว์ และกระตุ้นเซลล์มะเร็ง (Arsène et al., 2022) ดังนั้นทางสหภาพยุโรปจึงสั่งห้ามไม่ให้ใช้ยาปฏิชีวนะทุกชนิดในฟาร์มสัตว์เลี้ยง (World Animal Protection, 2022) เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงได้มีแนวทางเลือกอื่นเพิ่มมากขึ้นเพื่อลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ การควบคุมป้องกันทำได้โดยการให้สารเสริมในอาหาร ได้แก่ โปรไบโอติก (probiotic), พรีไบโอติก (prebiotic), ซินไบโอติก (synbiotics) (Ringseis and Eder, 2022), สมุนไพร (Yan et al., 2012) และ แบคเทอริโอเฟจ (Imklin et al., 2022)

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage)

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเฟจ (phage) คือไวรัสที่บุกรุกแบคทีเรีย แบคเทอริโอเฟจมีอยู่เป็นจำนวนมากบนโลกอาศัยอยู่ในทุกระบบนิเวศมีคุณสมบัติคล้ายกับไวรัสคือมีความหลากหลายชนิดของสารพันธุกรรมและทางด้านรูปร่าง สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจอาจจะเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง และถูกล้อมไว้ด้วยโปรตีนหรือ capsid ซึ่ง capsid อาจมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยมมีลักษณะเป็นส่วนหัวและหาง (ปริชาติ, 2562; อภิญญา, 2560) เฟจมีวงจรชีวิต 2 แบบคือ lytic (virulent phage) มีการทำลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนและปลดปล่อยอนุภาคออกจากเซลล์ และ lysogenic (temperate phage) จะแทรกสารพันธุกรรมเข้าไปในโฮสต์ของแบคทีเรียโดยไม่มีการทำลายแบคทีเรียเพราะเฟจมีความจำเพาะสูงกับแบคทีเรียจึงสามารถนำมาใช้หลายด้านเช่น เป็นเครื่องมือการตัดต่อพันธุกรรม จำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย และตรวจการติดตามการระบาดของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนั้นเฟจหรือ endolysin ยังถูกนำมาใช้ในการรักษาแบคทีเรียที่ดื้อยา สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (นิตยา และคณะ, 2553) ทำให้ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคเพิ่มมากขึ้น

ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

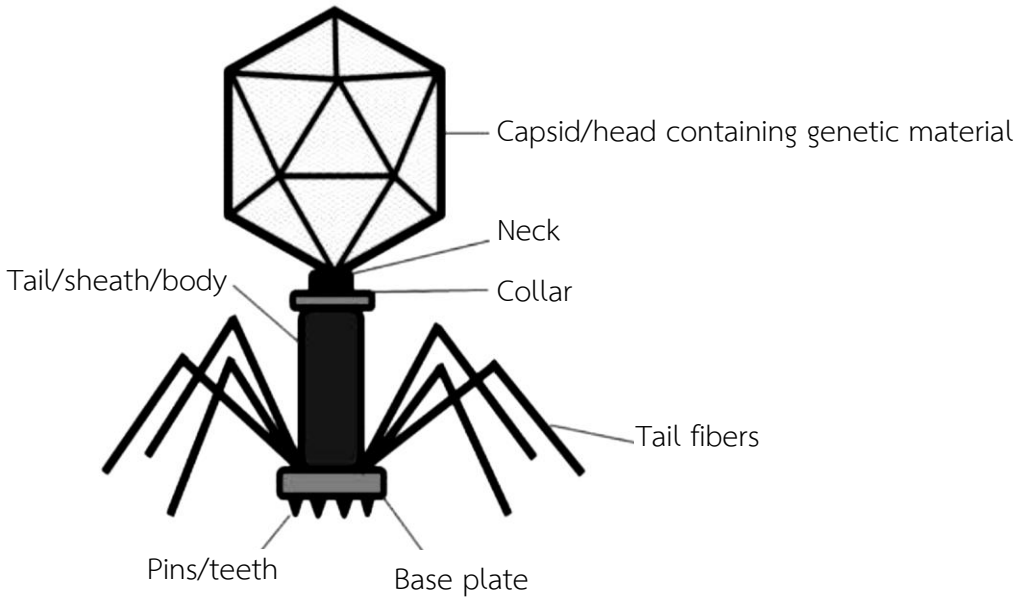
แบคเทอริโอเฟจได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1896 โดย Ernest Hankin นักแบคทีเรียวิทยาชาวอังกฤษรายงานว่ามีสิ่งที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ที่เขาสังเกตุในแม่น้ำคงคาที่สามารถฆ่าเชื้อ *Vibrio cholerae* ซึ่งถูกเก็บจากบริเวณเส้นทางน้ำเข้าเมืองและออกจากเมืองอัคระ ประเทศอินเดียที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาห์ตกโรคที่ไม่สามารถผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์และไม่ทนความร้อน มีขนาดเล็กแต่ยังไม่มีชื่อเรียกจากการนับจำนวนเชื้อพบว่าปริมาณเชื้อลดลงอย่างมากจากเส้นทางน้ำ

ออกเมืองเมื่อเทียบกับบริเวณเส้นทางน้ำเข้าเมือง ต่อมาในปี 1898 Gamaleya นักแบคทีเรียชาวรัสเซีย ได้สังเกตุว่าแบคเทอริโอเฟจมีการทำงานคล้ายกับ *bacillus subtilis* แต่ก็ยังไม่มีการคิดค้นเพิ่มเติม จนกระทั่ง Frederick Twort นักพยาธิวิทยาชาวอังกฤษได้นำมารายงานการค้นพบของ Hankin เมื่อ 20 ปีก่อน ว่ามีสาเหตุมาจากไวรัส เนื่องจากได้ค้นพบสารที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จากการกรองเชื้อ *Staphylococcus* และหยดสิ่งที่กรองลงในเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาเกิดมีบริเวณใสๆ แต่ยังไม่มีการอธิบายเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น มีเพียงคำจำกัดความและตีพิมพ์ลงในวารสาร จากนั้นได้มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจอีกครั้งอย่างเป็นทางการโดย Felix d'Herelle นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส-แคนาดาที่สถาบันปาสเตอร์ในปารีสได้ถูกมอบหมายให้ตรวจสอบโรคระบาดที่รุนแรงที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* ในกองกำลังทหารฝรั่งเศสที่ซานเมืองในปารีส เมื่อปี 1915 ระหว่างการตรวจสอบโรค d'Herelle ได้กรองตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยแล้วนำส่วนที่กรองได้มาผสมกับเชื้อ *Shigella* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพื่อสังเกตการเจริญของแบคทีเรียแล้วพบบริเวณใสๆ เกิดขึ้นโดยเขาจะเรียกว่า taches ต่อมาเรียกว่า taches vierges สุดท้ายเรียกว่า plaques การค้นพบนี้ได้ถูกนำมาเผยแพร่และได้ตีพิมพ์ในเอกสารประชุมวิชาการ ทั้งได้เสนอคำว่าแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) เป็นความหมายในภาษากรีกที่หมายถึง "นักกินแบคทีเรีย" ทั้งยังสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้เป็นครั้งแรก (Sulakvelidze et al., 2001) หลังจากที่ d'Herelle ค้นพบเฟจได้ไม่นานเขาเริ่มใช้ในทางการแพทย์เป็นครั้งแรกเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคบิดที่โรงพยาบาลเด็กในเมืองปารีสโดยทำการรักษาให้แบคเทอริโอเฟจในเด็กชายอายุ 12 ปี ที่ป่วยเป็นโรคบิดที่ได้ให้เฟจไปหนึ่งครั้งอาการเด็กชายเริ่มดีขึ้นเต็มที่ภายใน 2 ถึง 3 วัน แต่ผลการรักษานี้ยังไม่ได้รับการตีพิมพ์ทันที การใช้เฟจในการบำบัดโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรกโดย Richard Bruynoghe และ Joseph Maisin ในปี 1921 พวกเขาใช้เฟจในการบำบัดโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus* ได้มีการฉีดเฟจรอบๆ รอยแผลผ่าตัดแบบเปิดผลที่ได้รับคืออาการบวม ไข้และความเจ็บปวดลดลง หลังจากนั้นมีการรายงานผลการรักษานี้ในทั่วโลกและมีการก่อตั้งศูนย์อุตสาหกรรมการผลิตแบคเทอริโอเฟจในหลายประเทศ (American society for microbiology, 2022)

โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจมีขนาด 20-200 นาโนเมตร มีส่วนประกอบที่สำคัญเช่น genome หรือ nucleic acid โครงสร้างเป็นแบบ icosahedral มีอย่างน้อย 18 ยีน (gp) ที่แตกต่างกันมีโปรตีนที่หุ้มห่อสารพันธุกรรมเรียกว่า capsid ไม่ให้สารพันธุกรรมถูกทำลายที่ประกอบด้วยโปรตีนย่อย (capsomer) สารพันธุกรรมอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น โครงสร้างภายในลักษณะเป็นเส้น (linear) หรือเป็นวง (circular) หรือแยกเป็นส่วนๆ (segmented) นอกจากนี้ส่วนหางยังประกอบด้วย tail fibers, base plate และ pins ที่มีการยืด-หดได้ มีไขมันหุ้ม capsid ไว้อีก

ชั้นหนึ่งซึ่งเรียกว่า เอนเวลลอป (envelope) มีหน้าที่ช่วยในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ (Ackermann, 2003)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ
ที่มา : Doss et al. (2017)

การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

การจำแนกแบคเทอริโอเฟจได้จำแนกด้วยการใช้ตำแหน่งการเข้าติดเชื้อบนตัวรับของแบคทีเรียจำเพาะ รูปร่างลักษณะ โครงสร้างและความสมมาตรของโปรตีนเปลือกหุ้มหรือการจำแนกทางพันธุกรรมที่อยู่ในโครงสร้างของโปรตีนเปลือกหุ้ม แบคเทอริโอเฟจประกอบด้วย 1 order, 13 families และ 30 genera ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะมีหางรูปทรงหลายเหลี่ยม แบคเทอริโฟจส่วนใหญ่ประกอบด้วย dsDNA แต่จำนวนน้อยจะมี ssDNA ssRNA dsRNA เฟจถูกจัดจำแนกได้ดังนี้

1. เฟจมีหาง (tailed phages) พบมากถึง 96% ของเฟจทั้งหมดจัดอยู่ในลำดับ *Caudovirales* เฟจประกอบด้วยอนุภาคเปลือกโปรตีน (protein shell) และ dsDNA สายตรงเท่านั้น ไม่มีเยื่อหุ้มอนุภาค (envelop) ลักษณะหัวของเฟจ (capsid) เป็นทรงยี่สิบหน้า สิบสองมุม (icosahedra) ส่วนหางเป็นขด (helicles) หรือประกอบด้วยแผ่นที่ซ้อนกันเป็นชั้น (stacked disks) และมีโครงสร้างที่ปลายหางเพื่อใช้ในการเข้ายึดเกาะเช่น ฐาน (base plates) ปุ่ม (spikes) และเส้นใย (fibers) เฟจมีหางถูกแบ่งออกเป็น 3 วงศ์คือ *Siphoviridae*, *Myoviridae* และ *Podoviridae*

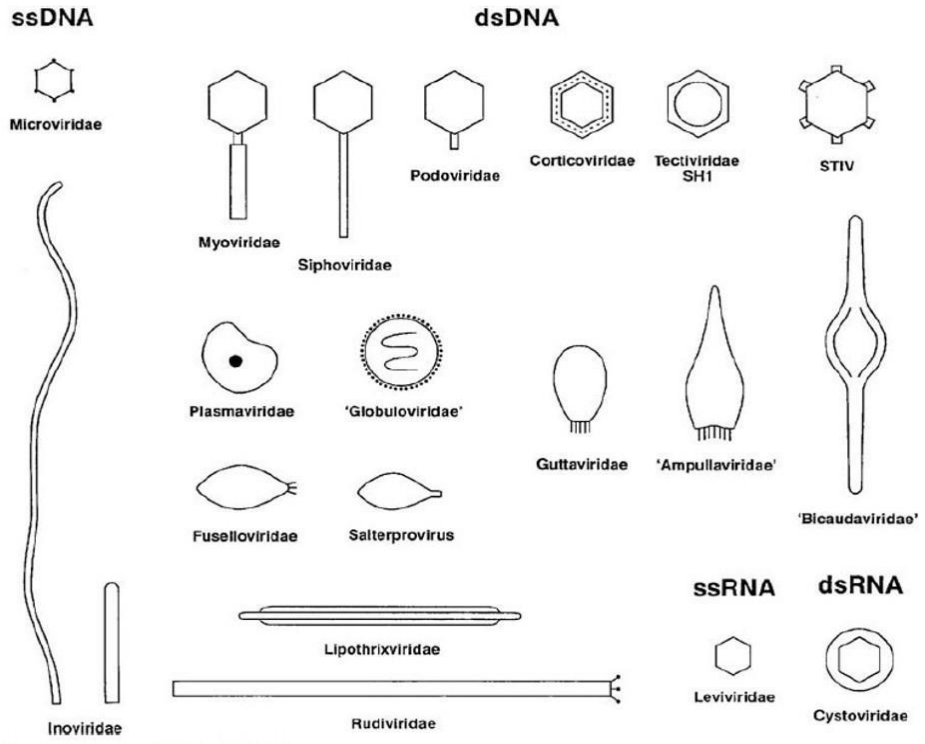
พบได้ประมาณร้อยละ 61, 25 และ 14 ของเฟจมีหางตามลำดับ ลักษณะของเฟจแต่ละวงศ์แตกต่างกันออกไป Siphovirus หางมีลักษณะยาวแต่ไม่สามารถยืดหดได้ในกลุ่ม Myovirus มีหางที่ยาวและสามารถยืดหดได้ ส่วน Podovirus มีลักษณะหางสั้นและไม่สามารถยืดหดได้

2. เฟจที่ไม่มีหาง (tailless phages) พบได้น้อยกว่า 4 % ที่เป็นไวรัสของแบคทีเรีย (bacterial viruses) แบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือเฟจที่มีหลายด้านหลายมุม (cubic phages) เป็นลักษณะอนุภาคมีทรงยี่สิบหน้า สิบสองมุมหรือสมมาตรลูกบาศก์ (cubic symmetry) เฟจมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous phages) มีสมมาตรแบบเกลียว (helical symmetry) และเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic phages) มีจำนวนน้อยและไม่มีสมมาตรแกน เฟจทั้งสามชนิดถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ 11 วงศ์ อย่างไรก็ตามเฟจอีก 5 วงศ์ที่รอการยืนยันการจำแนกนั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่มเฟจไม่มีหางนี้ด้วยซึ่งแยกได้ดังนี้

2.1. เฟจที่มีหลายด้านหลายมุม มี 5 วงศ์ได้แก่ *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA), *Tectiviridae* (dsDNA), *Leviviridae* (ssRNA) และ *Cystoviridae* (dsRNA) ส่วนอีก 2 วงศ์ได้แก่ Serpentine-Lake-Hispanica หรือ SH1 (dsDNA) และ Sulfolobus-Icosahedral-Turreted-Virus หรือ STIV (dsDNA) เป็นวงศ์ที่รอการยืนยันการจำแนกกลุ่มของเฟจ

2.2. เฟจมีลักษณะเป็นเส้นสายมี 3 วงศ์ได้แก่ *Inoviridae* (ssDNA), *Lipothrixviridae* (dsDNA) และ *Rudiviridae* (dsDNA)

2.3. เฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอนมี 3 วงศ์ได้แก่ *Plasmaviridae* (dsDNA), *Fuselloviridae* (dsDNA) และ *Guttaviridae* (dsDNA) ส่วนอีก 3 วงศ์ได้แก่ *Ampullaviridae* (dsDNA), *Bicaudaviridae* (dsDNA) และ *Gloculoviridae* (dsDNA) เป็นวงศ์ที่รอการยืนยันการจำแนกกลุ่มของเฟจ นอกจากนี้ His1 และ His2 เป็นเฟจที่ไม่ถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ใดๆ แต่ถูกจัดอยู่ในสกุล Salterprovirus (dsDNA) ซึ่งถือเป็น floating genus (Ackermann, 2003)



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา : Ackermann (2003)

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในเซลล์แบคทีเรีย

การเพิ่มจำนวนตามวงจรชีวิตในแบคทีเรียแบ่งได้ 2 วิธีได้แก่ lytic phage และ lysogenic phage

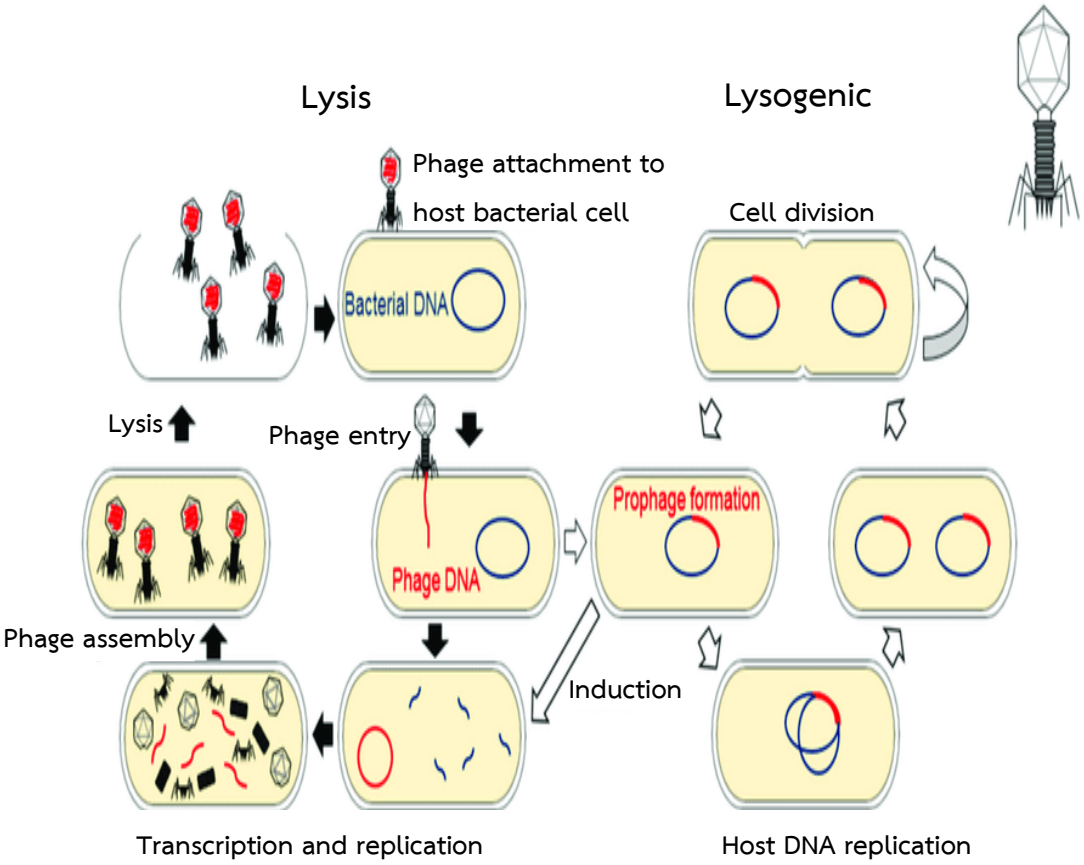
1. Lytic cycle

แบคเทอริโอเฟจจะใช้เส้นใยหางเพื่อยึดติดกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์และฉีดสารจีโนมเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อใช้กลไกของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวนและการขยายพันธุ์ของไวรัสตัวใหม่ที่ออกจากเซลล์โดยการสลายเซลล์ของแบคทีเรียภายในเซลล์โฮสต์ phages สังเคราะห์ holin lysis proteins และ endolysins เมื่อ holin ถูกโจมตี endolysins จะทำให้เกิดการสลายตัวของ peptidoglycan ที่เป็นผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

2. Lysogenic cycle

การติดเชื้อ lysogenic phage จะติดกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์แล้วรวมจีโนมเข้ากับ DNA ของแบคทีเรียเรียนกว่า prophage เมื่อถูกกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมความเครียดจากแบคทีเรีย ฯลฯ

วงจร lysogenic ถูกขัดจังหวะส่งผลให้การจำลองแบบซึ่งสร้างไวรัสที่แพร่กระจายต่อไปโดยไม่สูญเสียความจำเพาะของแบคทีเรียในเฟจ การอยู่รวมกันระหว่าง Lysogenic phage และโฮสต์สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกันได้เช่น สามารถเปลี่ยนให้แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคกลายเป็นแบคทีเรียก่อโรคได้ ตัวอย่าง *Corynebacterium diphtheria* ที่ถูก phage β lysogenize ทำให้มีการสร้าง toxin อย่างไรก็ตามวงจรชีวิตของเฟจสามารถเปลี่ยนแปลงระหว่างกันและกันได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพแวดล้อม สารอาหารภายใน host โดยเรียกเฟจที่มีวงจรชีวิตทั้งสองแบบนี้ว่า temperate phage เช่น phage λ ทั้งนี้แบคเทอริโอเฟจสามารถถูกทำลายได้ด้วยการยับยั้งโดยแสงยูวี (UV inactivation) การอบด้วยไอน้ำร้อน (autoclaving) และวิธีการฆ่าเชื้อ (disinfection) ตามมาตรฐานกำหนด (Singh et al., 2020)



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา : Batinovic et al. (2019)

กลไกการทำลายแบคทีเรีย

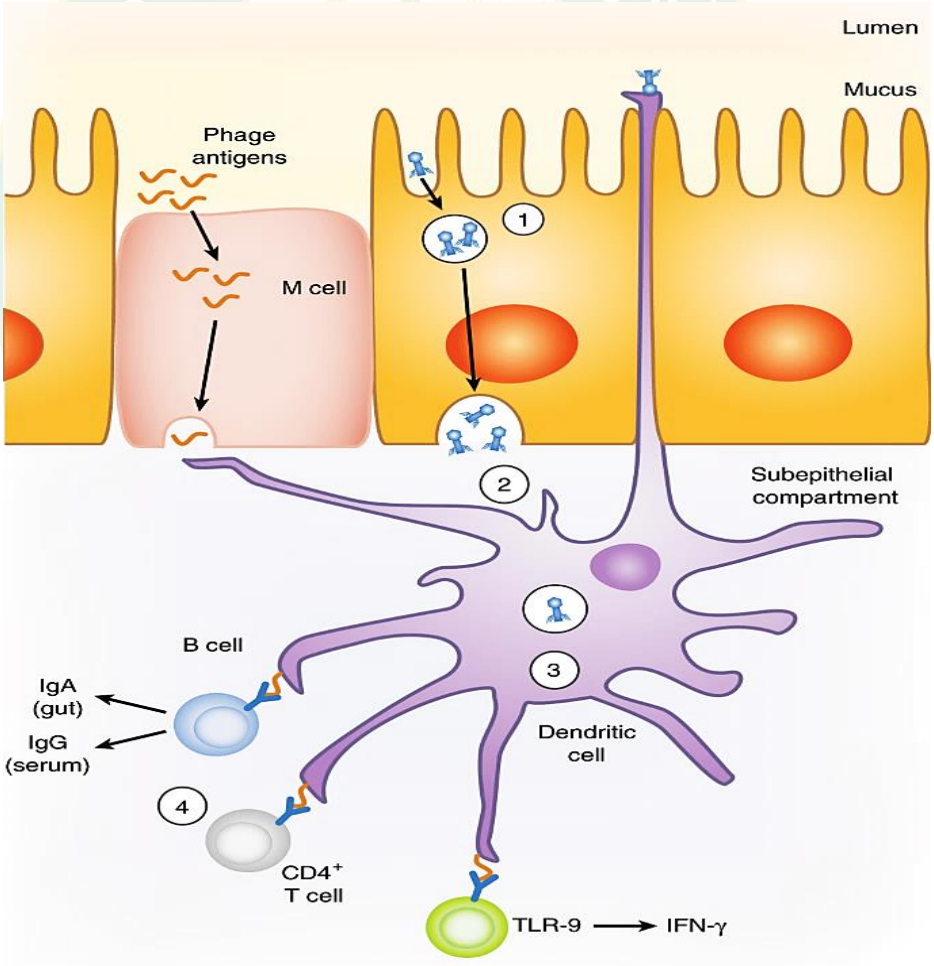
นิตยา และคณะ (2553) ได้กล่าวว่ากลไกในการทำงานของ lytic phage ต่อการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนทำให้เกิดการแตกของเซลล์ที่ทำงานร่วมกันประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ holin และ endolysin โดย holin เป็น hydrophobic proteins ขนาดเล็กโดยจะสอดแทรก holin monomer เข้าไปทางด้านในของเซลล์จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแล้วประกอบเป็น holin oligomers ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์ หลังจากนั้น endolysin เป็นเอนไซม์ที่สามารถผ่านเข้าไปแล้วย่อยทำลายชั้น peptidoglycan ส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและปลดปล่อย phage ออกมา

เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) มีผนังเซลล์ที่แตกต่างกันทำให้เกิดการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ต่างกันด้วยโดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้น peptidoglycan อยู่ด้านนอกสุดที่หนา ดังนั้น endolysin เพื่อทำลายแบคทีเรียจากทางด้านนอกจึงสามารถทำงานเป็น exolysis ได้ด้วยรวมถึงมี teichoic acid และ lipoteichoic acid เป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์ในการจดจำ โดยใช้ส่วนของ binding domain แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ที่กันไม่ให้เอนไซม์ทำงานจากด้านนอกแต่เมื่อชั้น lipopolysaccharide ถูกทำลายด้วยการใช้ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) หรือ detergents ยังสามารถถูกทำลายจากภายนอกได้ด้วยเอนไซม์ endolysin

แบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากเนื้อหมูและเนื้อวัวเป็นเชื้อ *S.Typhimurium* ATCC 13311 อยู่ในสกุล Tectiviriae เป็น lytic phage ที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์เซลล์เริ่มต้นสามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Newport และ *E. coli* เป็นต้น ที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับโฮสต์เซลล์จะมีคุณสมบัติ polyvalent phage host range ที่ใช้ในการใช้ควบคุมเชื้อได้หลากหลายโดยเฉพาะในกลุ่ม pathogenic Enterobacteriaceae (พัชรินทร์, 2564)

เมื่อมีการเข้าติดเชื้อในสภาวะปกติของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงการเข้าทำงานของเชื้อจุลินทรีย์นั้น แล้วแบคเทอริโอเฟจในทางเดินอาหารจะสามารถตอบสนองการกระตุ้นของภูมิคุ้มกันได้โดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตได้ดังนี้ เมื่อแบคเทอริโอเฟจมีการกระจายอยู่ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ระบบภูมิคุ้มกันบริเวณนั้นจะเกิดการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ซึ่งจะยอมให้แบคเทอริโอเฟจเข้าบุกรุก (phage tropism) แทรกซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผิวภายในลำไส้ด้วยการทำงานในกระบวนการต่างๆ เช่น endocytosis, transcytosis, exocytosis เป็นต้น ผ่านช่องว่างของเซลล์หรือผ่านการจับกิน (endocytosis) ของเซลล์ dendritic เมื่อแบคเทอริโอเฟจถูกจับกินสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในจะถูกนำเสนอต่อ T-lymphocyte ผ่านทางกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจน (major histocompatibility

complex, MHC) เพื่อไปกระตุ้น Toll-like receptor (TLR) pathways โดยเฉพาะ TLR9-dependent pathway ซึ่งผลจากการกระตุ้น TLR9 นำไปสู่การสร้างโปรตีนที่ใช้ในการสื่อสารภายในระบบภูมิคุ้มกัน (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในกลุ่ม type1 interferon(IFN-γ) ทำ ให้ CD4+ T cell ถูกกระตุ้นมากขึ้นส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น นอกจากนี้กลุ่มโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นการสร้าง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ได้แก่ interleukin (IL)-1, IL-6 และ tumor necrosis factor (TNF) เมื่อเซลล์ dendritic ทำหน้าที่จับกินแบคเทอริโอเฟจแล้ว บางส่วนมีการเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลือง (mesenteric lymph nodes) เพื่อกระตุ้น T cell และ B cell ภายหลังจากการกระตุ้นจะเดินทางกลับมายังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ด้านบนของลำไส้ (Peyer's patch) หรือกระจายไปตามผนังของลำไส้ (lamina propria) เพื่อป้องกันการติดเชื้อต่อไป (Sausset et al., 2020)



ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา: Sausset et al. (2020)

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในการป้องกันและรักษาโรค

ปัจจุบันได้มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจชนิดใหม่ๆ หลากหลายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่นเป็นเครื่องมือในการตัดต่อ DNA การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียหรือการตรวจติดตามการระบาดของแบคทีเรียก่อโรค และใช้เฟจหรือเอนไซม์ endolysin ทำลายแบคทีเรียที่ดื้อยาหรือสร้าง biofilm ในทางการแพทย์ ในด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชวภาพใช้เฟจในการควบคุมแบคทีเรียในอาหารและพืชผักผลไม้ (นิตยา และคณะ, 2553) ซึ่งเฟจจะมีลักษณะหลายอย่างเช่น มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีประสิทธิภาพมากในการสลายแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นเป้าหมายมีความปลอดภัยโดยจากการใช้ทางคลีนิคอย่างกว้างขวางในเขตยุโรปตะวันออก และอดีตสหภาพโซเวียดและการขายเฟจทางการค้าในปี 1940 ในสหรัฐอเมริกา ทั้งนี้ยังช่วยต่อสู้กับแบคทีเรียที่เกิดขึ้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (Sulakvelidze et al., 2001) และยังพบว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจดีกว่ายาปฏิชีวนะ tetracycline, ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprim ในการรักษาการติดเชื้อ *E. coli* ในหนู (Huff et al., 2004)

มีการรายงานจากบทความของประเทศโปแลนด์เกี่ยวกับการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยทั้งหมด 550 รายที่มีอายุตั้งแต่ 1 อาทิตย์ถึง 86 ปี ที่ป่วยเป็นภาวะโลหิตเป็นพิษจากแบคทีเรียได้แก่ *Staphylococci*, *Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella* และ *Salmonella* โดยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ แต่การรักษาไม่ได้ผล 518 ราย ซึ่งนำไปสู่การใช้เฟจในการรักษาต่อไปเริ่มต้นได้ทำการแยกเฟจที่มีศักยภาพสูงมากกว่า 250 lytic phages โดยขั้นตอนแรกให้เฟจทางปาก 3 ครั้งต่อวัน ก่อนอาหาร และหลังการให้เฟจกระเพาะอาหารจะเป็นกรด ดังนั้นจึงได้ให้ baking soda หรือน้ำเกลือแร่ bicarbonate ขั้นตอนต่อมาจะให้เฟจเฉพาะที่คือให้โดยตรงในบาดแผลขั้นตอนสุดท้ายคือการหยดเฟจ 2-3 หยดลงที่ตา ตรงกลางหู และเยื่อบุจมูก ในระหว่างนั้นได้มีการทดสอบอย่างต่อเนื่องจะใช้เวลา 1 ถึง 16 สัปดาห์ ผลการรักษาปรากฏว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจมีประสิทธิภาพสูงทำให้ผู้ป่วยหายถึง 92% และสูงขึ้น 94% กับผู้ป่วยทั้งหมด 518 ราย นอกจากนี้ยังมีการรายงานจากบทความของประเทศโซเวียดได้ทำการประเมินการรักษาของแบคเทอริโอเฟจสำหรับโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยมีเด็กทั้งหมด 30,769 ราย (อายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 7 ขวบ) ทำการศึกษาสองกลุ่มเด็กกลุ่มหนึ่งจำนวน 17,044 รายได้รับเชื้อ *Shigella* phage ทางปากทุกๆ 7 วัน และกลุ่มที่สองจำนวน 13,725 รายไม่ได้รับเฟจ ทำการทดลองจำนวน 109 วัน เด็กทั้งสองกลุ่มได้ถูกติดตามอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อตรวจหาเชื้อ *Shigella* spp. ผลปรากฏว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเฟจมีปริมาณเชื้อลดลงจาก 6.7 และ 1.76 ต่อเด็ก 1,000 คนตามลำดับ อุบัติการณ์ของเชื้อบิดสูงขึ้น 2.6 เท่า ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเฟจ 1.82 และ 0.7 ตามลำดับโดยมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในเด็กอายุระหว่างเด็ก

อายุ 6 เดือนถึง 1 ปี และต่ำสุดในเด็กอายุ 5 ถึง 7 ปี จากการศึกษาพบว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคท้องเสียในเด็กมีปริมาณเชื้อลดลงถึง 2.3 เท่า (Sulakvelidze et al., 2001)

การใช้แบคเทอริโอเฟจในสัตว์ทดลอง

แบคเทอริโอเฟจได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นตัวเลือกที่ดีในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียได้ ทำการศึกษาแยก 6 ชนิดและคัดเลือกจากประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อ *E. coli* 11 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรท้องเสียพบว่าหลังจากที่ได้รับเฟจ 24 ชั่วโมง การรักษาด้วยเฟจทั้งสองโดส (2×10^9 PFU/ตัวและ 2×10^{10} PFU/ตัว) สามารถลดเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ได้และส่งผลให้ลูกสุกรได้รับเฟจสูงขึ้นต่อวันในช่วงสองสามสัปดาห์แรก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตของสุกรได้อีกด้วย (Imklin et al., 2022) การใช้แบคเทอริโอเฟจในสุกรส่วนใหญ่ใช้เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *E. coli* และ *Salmonella* spp. เปรียบเทียบการใช้แบคเทอริโอเฟจผสม (phage cocktail) ระหว่าง P433/1 และ P433/2 กับการใช้ P433/1 อย่างเดียวด้วยวิธีการป้อนให้ลูกสุกรท้องเสียจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (P433 O20:K101, 987P) พบว่าสามารถบรรเทาอาการท้องเสียและลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติประเมินผลการใช้แบคเทอริโอเฟจ CJ12 ปริมาณ 10^6 PFU/g และ 10^8 PFU/g ผสมอาหารในอัตราส่วน 1:1,000 (0.1%) เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) โดยป้อนเชื้อปริมาณ 10^{11} CFU ผ่านทางปากพบว่ากลุ่มที่ป้อนแบคเทอริโอเฟจทั้งสองกลุ่มสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้มากถึง 63.92% และ 60.73% ตามลำดับทำให้บรรเทาอาการท้องเสียในสุกรได้มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ป้อนแบคเทอริโอเฟจเพียงสามวันหลังทำการ (Smith and Huggins, 1982)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Imklin et al. (2022) ได้ทำการศึกษาการใช้แบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในสุกรอนุบาลได้ทำการแยกและคัดเลือกเฟจที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 11 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรท้องเสียได้แบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่ม control และกลุ่ม bacterial control (BC), กลุ่ม two phage control (PC) และ กลุ่ม two phage treatment (PT) สำหรับกลุ่ม PC และ PT จะให้ phage cocktail สองระดับคือ 2×10^9 PFU/ตัว และ 2×10^{10} PFU/ตัว กลุ่ม control จะได้รับ buffer และ 3 กลุ่มจะได้รับเชื้อ *E. coli* cocktail ที่มีความเข้มข้น 2×10^9 CFU/ตัว ด้วยการป้อนให้สุกรทางปากในเวลา 0 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นรอประมาณ 30 นาทีทำการป้อนเฟจ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระของกลุ่ม PT ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 เมื่อเทียบกับกลุ่ม BC สุดท้ายนี้ได้เผยให้เห็นการรักษาด้วยเฟจสามารถปรับค่าองค์ประกอบของแบคทีเรียในลำไส้ได้ ยิ่งกว่านั้น phage cocktails ที่กำหนดส่งผลให้ลูกสุกรมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงสองสามสัปดาห์แรกทั้งในกลุ่ม PC และกลุ่ม PT ได้รับปริมาณฟาจที่สูงขึ้น การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจอาจเป็นทางเลือกที่

สามารถทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตของสุกรได้

การเปรียบเทียบประสิทธิผลของการใช้แบคเทอริโอเฟจกับยาต้านจุลชีพ

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแนวทางส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการทำลายหรือควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้ลดลงได้มากที่สุดจึงต้องมีการอาศัยการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นสำคัญหลังจากมีอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้นทำให้มีการตระหนักถึงการรักษาทางเลือกอื่นเช่นแบคเทอริโอเฟจเป็นต้น ดังนั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบการใช้ยาต้านจุลชีพกับแบคเทอริโอเฟจสามารถยกตัวอย่างได้ดังนี้

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจและยาต้านจุลชีพ

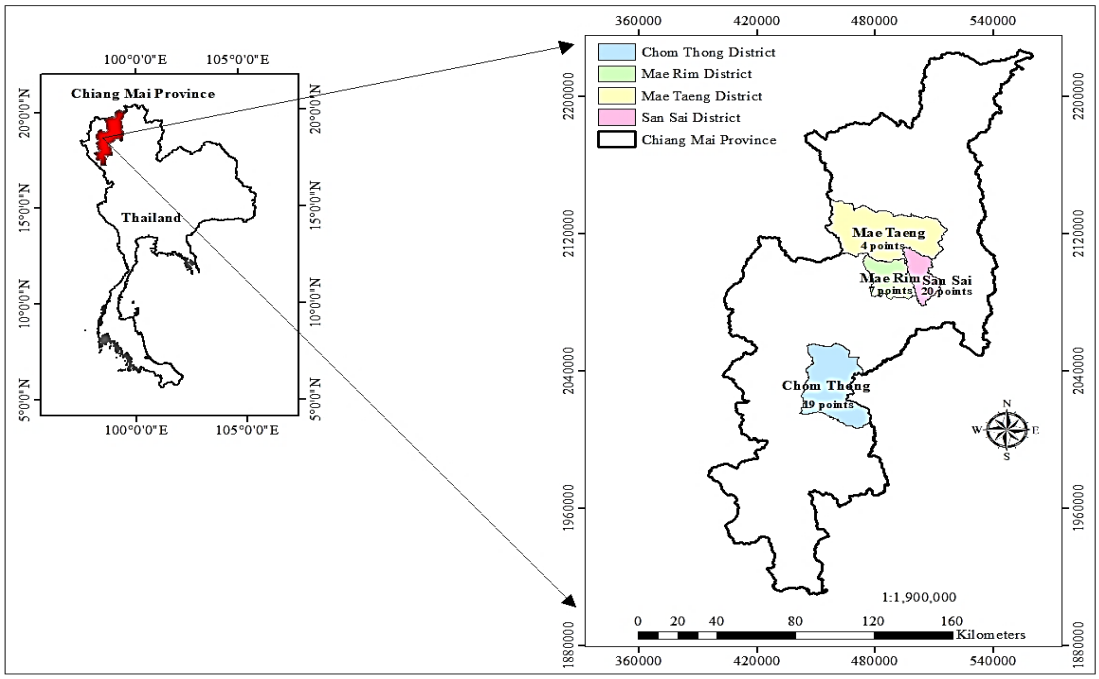
	ยาปฏิชีวนะ	**แบคเทอริโอเฟจ**
ความจำเพาะ (specificity)	กำจัดเชื้อแบคทีเรียเป็นวงกว้าง ส่งผลกระทบมากกว่าเชื้อเป้าหมาย	มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อเป้าหมายเป็นหลัก
ผลข้างเคียง (side effects)	มีอาการแพ้และเกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร	ไม่มีผลข้างเคียงใดๆ
ความต้านทาน (resistance)	เกิดขึ้นได้และไม่จำกัดเฉพาะเชื้อเป้าหมาย	เกิดขึ้นได้แต่สามารถปรับตัวตามการพัฒนาของเชื้อเป้าหมาย
การพัฒนา (development)	ใช้เวลานานและมีราคาแพง	ใช้เวลารวดเร็ว

ที่มา: Sulakvelidze et al. (2001)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจะใช้เชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 50 isolates ที่แยกได้จากอุจจาระของลูกสุกรระยะดูดนมที่แสดงอาการท้องเสียที่อำเภอจอมทอง 19 isolates อำเภอแม่ริม 7 isolates อำเภอแม่แตง 4 isolates และอำเภอสันทราย 20 isolates จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นตัวอย่างในช่วงปี พ.ศ 2563-2565 ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนการนำเชื้อ *E. coli* คือนำเชื้อออกมาจากตู้แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (*EMB*) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วนำโคโลนีเดี่ยวมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar (TSA) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่อมานำเชื้อมาลงใน slant TSA แล้วบ่มข้ามคืนเพื่อนำเชื้อไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Petsong et al., 2019)



ภาพที่ 6 แผนที่การเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ในช่วงปี พ.ศ 2563-2565

การเตรียมแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจที่จะใช้ทดสอบมี 5 ชนิดได้แก่ WPEC1, WPEC2, WPEC3, WPEC4 และ WPEC5 ที่เป็น wild type โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ

อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีความเข้มข้น 10^9 PFU/mL และเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป (Pelyuntha et al., 2022)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยจะทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion ทำการทดสอบเชื้อ *E. coli* 50 isolates ใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 8 ชนิดคือ cephalexin (30 µg), neomycin (30 µg), enrofloxacin (5 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg), oxytetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), amoxycillin (10 µg) และ colistin (10 µg) โดยดำเนินการทดสอบตามมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ทำการเพาะเชื้อ *E.coli* เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวใช้ loop เขี่ยเชื้อ 4-5 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 125 rpm นำมาวัดความขุ่น 0.5 McFarland standard แล้วดูดเชื้อปริมาตร 100 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ใช้วิธี spread plate เกลี่ยเชื้อให้ทั่ว จากนั้นนำแผ่นยาที่จะใช้ทดสอบวางแต่ละจุดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเกณฑ์กำหนด 3 ระดับคือมีความไวต่อยา (Susceptibility; S) มีความไวต่อยาปานกลาง (Intermediate; I) และดื้อยา (Resistance; R) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016)

ตารางที่ 4 มาตรฐานเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

Class	Antimicrobial agent	Disk content	Zone diameter (mm)		
			S	I	R
Cephalosporins	Cephalexin	30 µg	≥18	15-17	≤14
Quinolone	Enrofloxacin	5 µg	≥17	13-16	≤12
Sulfonamide	Sulfamethoxazole-Trimethoprim	25 µg	≥16	11-15	≤10
Tetracycline	Oxytetracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14
Aminoglycoside	Neomycin	30 µg	≥17	15-16	≤14
	Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12
Penicillin	Amoxycillin	10 µg	≥18	14-17	≤13
Polypeptide	Colistin	10 µg	≥17	12-16	≤11

ที่มา: Clinical and Laboratory Standards Institute (2016)

การศึกษาช่วงกว้างในการยับยั้งของแบคเทอริโอเฟจ (Host-range determination)

การศึกษาช่วงกว้างในการยับยั้งของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการเตรียมข้างต้นด้วยการใช้วิธี spot test ต่อเชื้อ *E. coli* จำนวน 50 สายพันธุ์โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหาร Tryptone Soya Broth (TSB) บ่มข้ามคืนแล้วปรับความขุ่นตามค่ามาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันกับ TSB + 0.7% agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเททับลงบน TSA รอจนกระทั่งอาหารแข็งตัวแล้วหยดแบคเทอริโอเฟจปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่มีความหนาแน่น 10^9 PFU/mL นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสังเกตและบันทึกผลว่ามีส่วนใสที่เกิดจากปฏิกิริยาของการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียด้วยแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะ (clear zone) เกิดขึ้นในบริเวณตำแหน่งที่หยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจหรือไม่ โดยกำหนดให้ +++ คือเกิดวงใสทั้งหมด ++ คือเกิดวงใสบางส่วน + คือเกิดวงใสเล็กน้อย และ – คือไม่พบวงใส ตามวิธีของ Petsong et al. (2019)

การเตรียมสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage cocktail) และการทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง

นำเอาแบคเทอริโอเฟจจำนวน 5 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ซึ่งจะได้สารผสมแบคเทอริโอเฟจที่มีความเข้มข้น 10^9 PFU/mL จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทำการผสมสารผสมแบคเทอริโอเฟจปริมาตร 20 mL เข้ากับเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนจากการดื้อยาปฏิชีวนะและเชื้อควบคุมคุณภาพการทดลองคือ *E. coli* ATCC25922 ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 10^4 CFU/mL ปริมาณ 2 mL และ TSB 18 mL ในขวดชมพู่ (Flask) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำมานับจำนวนเชื้อ *E. coli* ที่ลดลง ใช้อาหารจำเพาะ Eosin Methylene Blue Agar (EMB) แล้วเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ไม่มีการเติมสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (Pelyuntha et al., 2021)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการป้องกันเชื้อ *E. coli*

การศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาในสุกรลูกผสมระยะดูดนม อายุ 7-14 วันจำนวน 90 ตัวจากแม่ 9 ตัว คำนวณตัวอย่างด้วยการใช้โปรแกรม G*Power Effect size = 0.8 กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการทดลองที่ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้และวิสุทธิ์ฟาร์ม อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มีการควบคุมปัจจัยอื่นๆ เหมือนกันได้แก่อายุ ลักษณะการเลี้ยงดูและสภาพแวดล้อม ใช้แผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized completely block design, RCBD) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มต่อครอก กลุ่มละ 45 ตัว

คือกลุ่มควบคุมจะป้อน Phosphate Buffer Saline (PBS) น้ำหนักตัว 2.5kg/1mL และกลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจความเข้มข้น 10^9 PFU/mL น้ำหนักตัว 2.5kg/1mL (Kim et al., 2017) โดยจะใช้ไซริงค์ป้อนให้ทางปากลูกสุกร วิธีเก็บตัวอย่างจะเก็บโดยใช้ไม้สว็อปทางทวารของสุกรและเก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส จะเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 3 5 7 ดัดแปลงจากวิธีของ Kim et al. (2015) ซึ่งลูกสุกรถูกเลี้ยงในโรงเรือนแบบปิด แม่สุกรจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ ส่วนลูกสุกรดูดนมแม่ในคอกคลอดทางฟาร์มจะทำการล้างพื้นคอกทุกเช้า-เย็นก่อนเข้าฟาร์มจะเปลี่ยนรองเท้าและพ่นยาฆ่าเชื้อก่อนทุกครั้ง

นำตัวอย่างมาเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการผสมกับสารละลาย Buffered Peptone Water (BPW) 2 mL ในหลอดทดลอง ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) โดยตรวจวิเคราะห์ total plate count ด้วยวิธี pour plate ขั้นตอนแรกใช้ pipette ดูดเอาตัวอย่าง 1 mL มาใส่ในหลอดที่เตรียม PBS 9ml เพื่อ dilute ให้ได้ 10^{-1} ถึง 10^{-8} ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาใส่ในเพลทอย่างละ 1 mL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB) จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 mL อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ โดยจะหมุนจานเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันดี วางจานเพาะเชื้อไว้ให้วุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พอครบเวลาทำการนับเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 แล้วนำมาคำนวณค่าจุลินทรีย์มาตรฐานคือ Colony Forming Unit (CFU) ดัดแปลงจากวิธีของ Pelyuntha et al. (2022) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$CFU/g = \frac{\sum C}{(v1n1 + 0.1n2)\, d}$$

เมื่อ $\sum C$ = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

v1 = ปริมาณของ inoculum ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

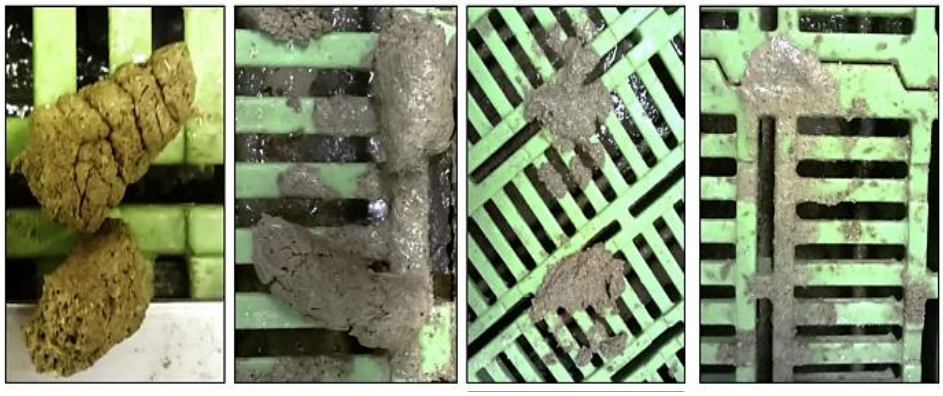
n1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก

n2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

การประเมินคะแนนมูลสุกร (Fecal score)

การให้คะแนนอาการท้องเสีย วัดได้จากการให้คะแนนอุจจาระ 0 คืออุจจาระปกติ 1 คืออุจจาระอ่อนนุ่ม 2 คืออุจจาระอ่อนค่อนไปทางเหลว 3 คืออุจจาระเหลวเป็นน้ำ โดยบันทึกอาการทุกวันเวลา 9.00 น. เป็นเวลา 7 วัน เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยคะแนนของอุจจาระสุกรตามวิธีของ Kim et al. (2017)



0 = Normal feces 1 = Soft feces 2 = Mild diarrhea 3 = Severe diarrhea

ภาพที่ 7 การให้คะแนนอุจจาระของสุกร

ที่มา : Pérez-Calvo et al. (2019)

การศึกษาสมรรถภาพการเจริญเติบโต

บันทึกน้ำหนักตัวของลูกสุกรเมื่อเริ่มการทดลองทำการชั่งน้ำหนักทุกวัน เป็นระยะเวลาการทดลอง 7 วัน เพื่อนำไปคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain, BWG) และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain; ADG) ตามวิธีของ Won et al. (2021) โดยมีสมการคำนวณดังนี้

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain, BWG) = น้ำหนักสุดท้าย - น้ำหนักเริ่มต้น

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย (average daily gain, ADG)} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย – น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในหลอดทดลอง เพื่อหาค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANNOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวม (log10) ด้วย Paired t-test ส่วนคะแนนมูลสุกรทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนด้วย Kruskal-Wallis test และสมรรถภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรวิเคราะห์ด้วย t-test โดยใช้โปรแกรม SAS OnDemand for Academics ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P<0.05$)

สถานที่ดำเนินงาน

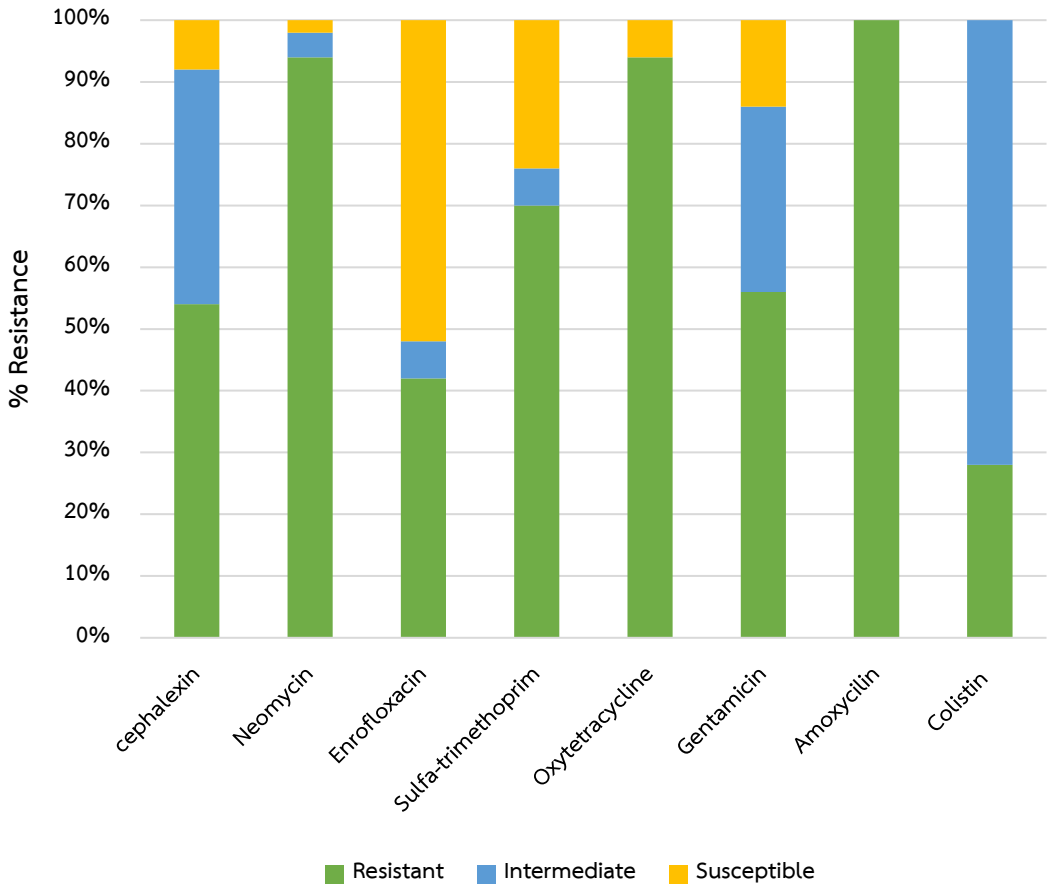
ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
วิสุทธิ์ฟาร์ม อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้เชื้อ *E. coli* 50 isolates ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรที่ท้องเสีย และใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 8 ชนิดได้แก่ cephalexin (30 µg), enrofloxacin (5 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg), oxytetracycline (30 µg), neomycin (30 µg), gentamicin (10 µg), amoxycillin (10 µg) และ colistin (10 µg) เมื่อทำการเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* พบว่าเชื้อ *E. coli* 50 isolates มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amoxicillin สูงที่สุดคือ 100% รองลงมาได้แก่ oxytetracycline และ neomycin 94%, sulfamethoxazole-trimethoprim 70%, gentamicin 56%, cephalexin 54%, enrofloxacin 42% และ colistin 28% ตามลำดับ และมีเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด (100%) คือ VC22 ส่วนเชื้อ *E. coli* isolates อื่นๆ มีลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีอัตราร้อยละ 87.50 (10 isolates), 75.00 (15 isolates), 62.50 (11 isolates), 50.00 (8 isolates), 37.50 (4 isolates) และ 25.00 (1 isolate) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 8 และจากการทดสอบพบว่าเชื้อ *E. coli* 50 isolates จัดว่าเป็นเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multidrug-resistant strains) โดยดื้อยาปฏิชีวนะมากกว่า 3 กลุ่ม ซึ่งคิดเป็น 98% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nguyet et al. (2022) ที่พบว่าการแยกเชื้อ *E. coli* จากสุกรท้องเสียพบอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะที่สูงคือ amoxicillin (100%) ตามด้วย oxytetracycline 91.9% enrofloxacin (89.2%), trimethoprim/sulfamethoxazole (86.5%), amoxicillin: clavulanic acid (81.1%), colistin และ gentamicin (75.7%), ceftriaxone และ ceftiofur (64.9%) และ ceftazidime (35.1%) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการรายงานของ Mitchaothai and Srikijkasemwat, (2022) ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่สูงที่สุดคือ 98.18% เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะพื้นฐานที่ใช้ในฟาร์มสุกร นอกจากนี้การรายงานของ นริศร, (2553) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากน้ำเสียมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือ sulfamethoxazole-trimethoprim มากที่สุด 95.65% รองลงมาได้แก่ ampicillin, kanamycin, oxytetracycline, tetracycline, doxycycline, chloramphenicol, cephalothin, streptomycin, enrofloxacin, nalidixic acid, gentamicin, norfloxacin ตามลำดับ และจะมีความไวต่อยา ofloxacin, polymyxin B, cefotaxime และ colistin ในปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย ซึ่งในฟาร์มสุกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดเป็นอันดับแรก

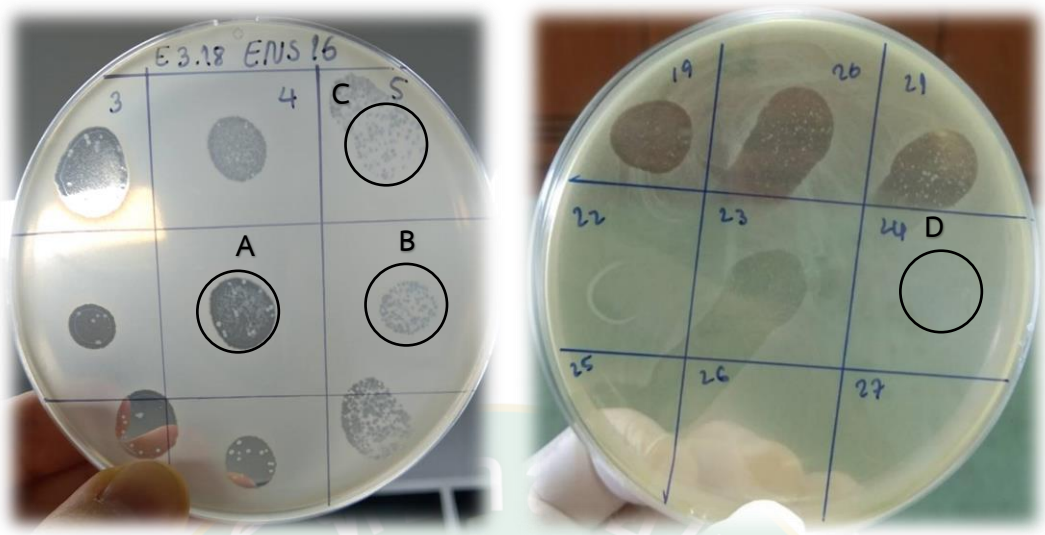
ได้แก่ amoxycillin, enrofloxacin, oxytetracycline, gentamicin และ neomycin โดยเกษตรกรใช้ amoxycillin มากที่สุดคิดเป็น 66.7% เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ แต่เกษตรกรมีความรู้ระดับปานกลางเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่ใช้อย่างไม่สมเหตุสมผลได้แก่ ใช้ไม่ตรงตามข้อบ่งใช้ และใช้มากเกินความจำเป็น (ณัฐธิดา, 2562) และเกษตรกรรายย่อยส่วนใหญ่ 64% ตัดสินใจเองว่าจะให้ยาปฏิชีวนะเมื่อไหร่ (Ström et al., 2017) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อเกิดการดื้อยาในอัตราที่ค่อนข้างสูง เพื่อให้ตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาจำเป็นต้องมีการติดตามเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาอย่างต่อเนื่องตลอดจนถึงการให้ความรู้แก่เกษตรกรในการใช้ยารวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสุกรต่อไป



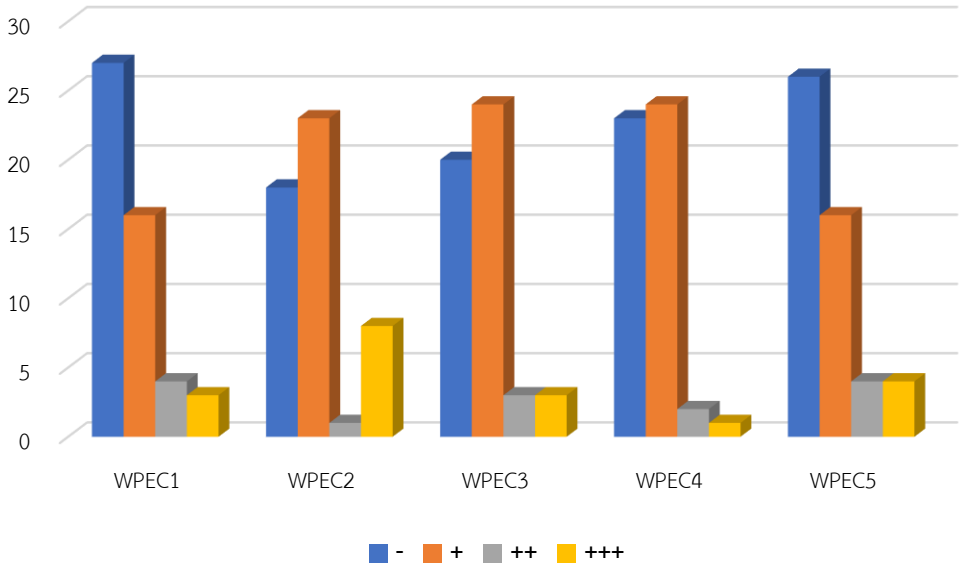
ภาพที่ 8 กราฟการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดของเชื้อ *E. coli*

การศึกษาช่วงกว้างในการยับยั้งของแบคเทอริโอเฟจ (Host-range determination)

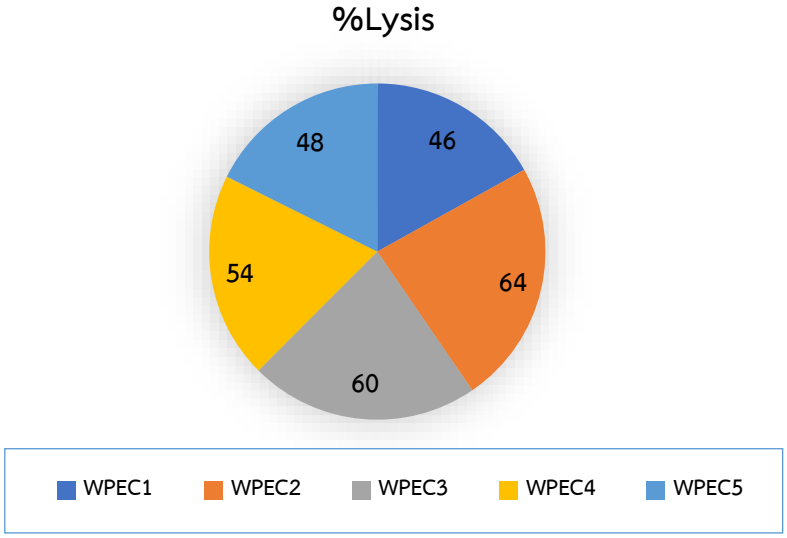
จากการศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรีย *E. coli* isolates ต่างๆ ด้วยวิธี spot test พบว่าแบคเทอริโอเฟจ 5 ชนิดได้แก่ WPEC1, WPEC2, WPEC3, WPEC4 และ WPEC5 สามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ที่ทดสอบได้โดยแสดงให้เห็นถึง lysis ability ของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดโดย WPEC2 ให้ค่า lysis ability สูงที่สุดถึง 64.00% รองลงมาเฟจ WPEC3 สามารถทำลายเชื้อได้ 60.00% ส่วนเฟจ WPEC4, WPEC5 และ WPEC1 มีความสามารถทำลายเชื้อได้ 54.00 48.00 และ 46.00% ตามลำดับ (ภาพที่ 11) ซึ่งจะสังเกตุลักษณะโซนใสๆ (clear plaque lysis) ในระดับที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ O'Flynn et al. (2004) ได้ทำการทดสอบแบคเทอริโอเฟจที่แยกตัวอย่างได้จากผู้ป่วยทางเดินอาหารที่โรงพยาบาล ตัวอย่างจากฟาร์มโคนมและโรงฆ่าสัตว์ นำมาทดสอบกับเชื้อ Nontoxigenic *E. coli* O157:H7 2 สายพันธุ์ และ Toxigenic *E. coli* O157:H7 12 สายพันธุ์ พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 ชนิดสามารถทำลายเชื้อที่เป็น Nontoxigenic *E. coli* O157:H7 ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์และ Toxigenic *E. coli* O157:H7 ได้ 10 สายพันธุ์ ส่วนการรายงานของ Xiao et al. (2023) ได้ทำการศึกษาแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา colistin ได้มีการรวบรวมเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา colistin จากแหล่งที่มาแตกต่างกันโดยพบว่าแบคเทอริโอเฟจ vB_EcoStr-FJ63A สามารถทำลายเชื้อได้ 21 สายพันธุ์จาก 23 สายพันธุ์ด้วยวิธี spot test และจากการรายงานของ Songphasuk et al. (2022) ที่พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 32 ชนิดที่แยกได้จากน้ำเสียมีความสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ได้โดยมีความเฉพาะเจาะจงต่อโฮสต์ของเฟจเอง ในขณะที่เฟจตัวอื่นๆ มีประสิทธิภาพต่อการทำลายแบคทีเรียอีก 2 ถึง 5 สายพันธุ์ นอกจากนี้ Mirzaei and Nilsson, (2015) ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบการแยกแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี spot test และการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (EOP) โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำเสียแล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. พบว่าแบคเทอริโอเฟจ SU57 และ SU16 สามารถทำลายเชื้อได้มากถึง 15% (11 สายพันธุ์) และ 60% (43 สายพันธุ์) ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบ EOP สำหรับเฟจ SU57 และ SU16 มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อได้ 1 ถึง 8 สายพันธุ์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการทดสอบ EOP และ spot test พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียลดลงได้เกือบครึ่ง ดังนั้นการแยกเฟจจำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพแต่ละตัวก่อนนำมาทดลองเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย



ภาพที่ 9 การทดสอบแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียด้วยวิธี spot test
A คือเกิดวงใสทั้งหมด (+++), B คือเกิดวงใสบางส่วน (++), C คือเกิดวงใสเล็กน้อย (+) และ D คือไม่พบวงใส (–)



ภาพที่ 10 กราฟประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* isolates ต่างๆ



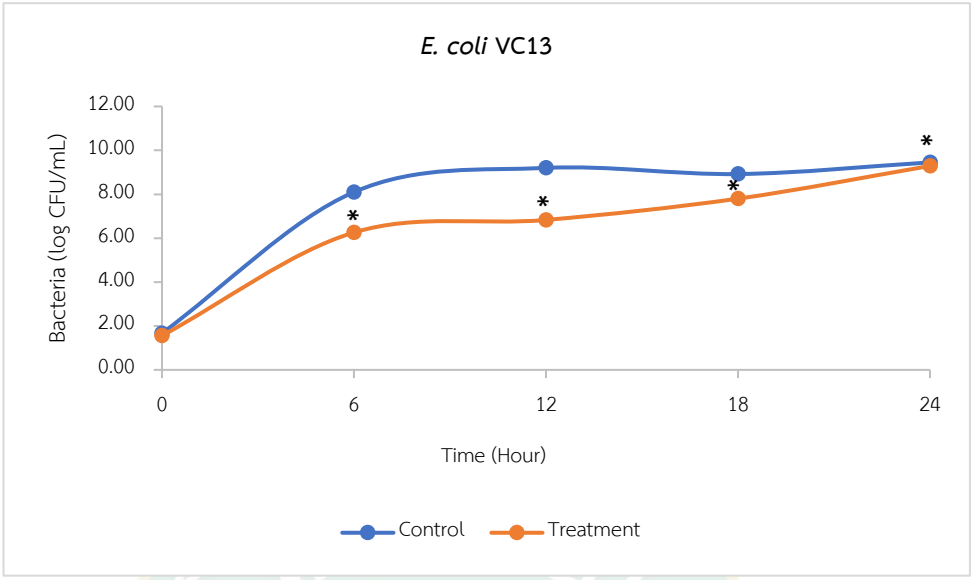
ภาพที่ 11 กราฟประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการทำลายเชื้อ *E. coli* isolates ต่างๆ

การศึกษาสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (phage cocktail) ต่อเชื้อ *E. coli* ในระดับหลอดทดลอง *(in vitro)*

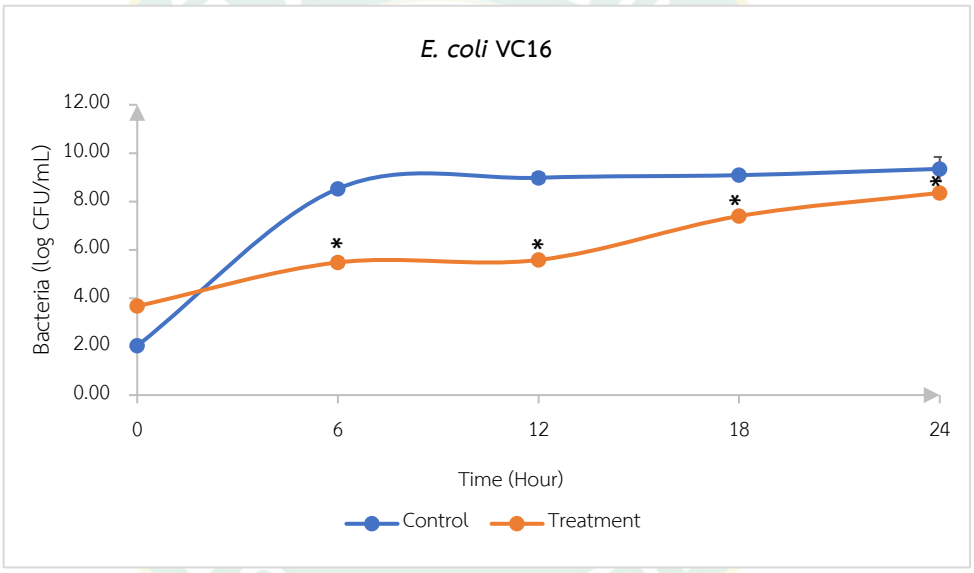
การศึกษาสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะและเชื้อที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง *E. coli* ATCC 25922 ทั้งหมดจำนวน 5 สายพันธุ์ในหลอดทดลองพบว่า เมื่อพัฒนาเป็นสารผสมแบคเทอริโอเฟจสามารถลดเชื้อ *E. coli* ได้ทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสามารถลดเชื้อ *E. coli* VC13 VC16 VC19 และ VC34 ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้ที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง นอกจากนี้สารผสมแบคเทอริโอเฟจสามารถลดเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิงได้ที่ 6 ชั่วโมง และสามารถลดเชื้อ *E. coli* ได้ทั้งหมดที่ 12 ชั่วโมงของการทดลองอย่างมีนัยญสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiao et al. (2023) ที่ทำการศึกษาแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา colistin พบว่าแบคเทอริโอเฟจ vB_EcoStr-FJ63A ทั้งสองระดับ MOI 10 และ 100 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเกิดการฆ่าเชื้อได้เร็วที่สุดที่เวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อมีการเพิ่มขึ้นแต่ยังคงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Amarillas et al. (2017) ที่ได้แยกแบคเทอริโอเฟจจากบ่อน้ำและน้ำเสียแล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* พบว่าหลังการทดสอบ 4 ชั่วโมงในระดับ MOI 1.0 และ 100 ทำให้จำนวนเชื้อ *E. coli* ลดลง 3 log-unit เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคิดเป็น 94% ตลอดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Niu et al. (2021) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริ

โอเฟจ (T5, T1, T4 และ rV5) ต่อเชื้อ *E. coli* O157 พบว่าแบคเทอริโอเฟจชนิด T5 มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเฟจชนิดอื่น เมื่อทำการผสมเฟจ T4 และ T5 กลับทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อต่ำลง ซึ่งแตกต่างจากการใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจสองแบบ (T1, T4 และ T5) และ (T5, T1, T4 และ rV5) พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อสูงที่สุด 95% นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Pelyuntha ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *Salmonella* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเฟจทั้ง 3 ชนิดและสารผสมแบคเทอริโอเฟจสามารถลดเชื้อ *Salmonella* ลงได้ที่ 6 ชั่วโมง โดยเฉพาะแบคเทอริโอเฟจ WP109 หรือ WP128 และสารผสมแบคเทอริโอเฟจในระดับ MOI100 ทำให้เชื้อลดลงที่ 12 และ 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Pelyuntha et al., 2021) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ Petsong et al. (2019) ได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยทำการทดสอบแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *Salmonella* พบว่าสารผสมแบคเทอริโอเฟจ (KP4, KP5 และ KP50) ทำให้จำนวนเชื้อ *S. Enteritidis* และ *S. Typhimurium* ลดลงอย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุดถึง 4 log CFU/mL ที่ MOI100 หลังจาก 4 ชั่วโมงของการทดลอง ส่วนงานวิจัยของ Yamaki et al. (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจ FSP1 ต่อเชื้อ *Morganella morganii* NBRC3848 ที่ระดับ MOI1.0 สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ที่ 3.5 log CFU/mL ส่วน MOI10 ตรวจไม่พบจำนวนแบคทีเรีย แต่จำนวนเชื้อแบคทีเรียมีการเพิ่มในชั่วโมงที่ 2 (MOI1.0) และชั่วโมงที่ 5 (MOI10) ในการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อ *E. coli* เริ่มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่ 18 และ 24 ชั่วโมงของการทดลองแต่ยังต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) สาเหตุคาดว่าอาจเกิดจากแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเพื่อไม่ให้แบคเทอริโอเฟจเข้ามาทำลายตัวเอง การเปลี่ยนแปลงของตัวจับ receptor การปิดกั้นการดูดซึมเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียมีความต้านทานแบคเทอริโอเฟจ (phage-resistance bacteria) (Yordpratum et al., 2011) และอาจมีปัจจัยอย่างอื่นที่ส่งผลต่อการทำงานของแบคเทอริโอเฟจเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และอาจมีการสร้างกระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มากกว่าแบคเทอริโอเฟจที่ต้องอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้าน ทำให้แบคทีเรียมีจำนวนที่มากกว่าแบคเทอริโอเฟจ (Yamaki et al., 2014) ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียอาจเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นใหม่หรือแบคทีเรียมีความสามารถต้านทานสลายแบคเทอริโอเฟจได้ (bacterial insensitive mutants (BIMs)) (Amarillas et al., 2017) จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าเชื้อ *E. coli* ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นอาจเป็นเพราะอัตราส่วนที่ใช้ในการทดสอบไม่สมดุลกันจึงทำให้เชื้อ *E. coli* มีการปรับตัวในการป้องกันการทำลายจากแบคเทอริโอเฟจ รวมถึงเชื้อ *E. coli* เพิ่มจำนวนที่หนาแน่นมากกว่าแบคเทอริโอเฟจ

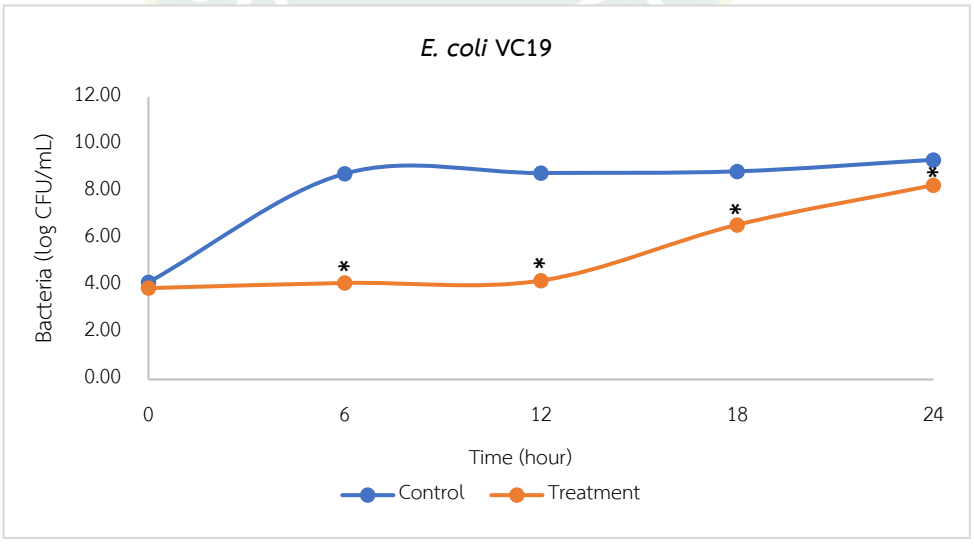
A

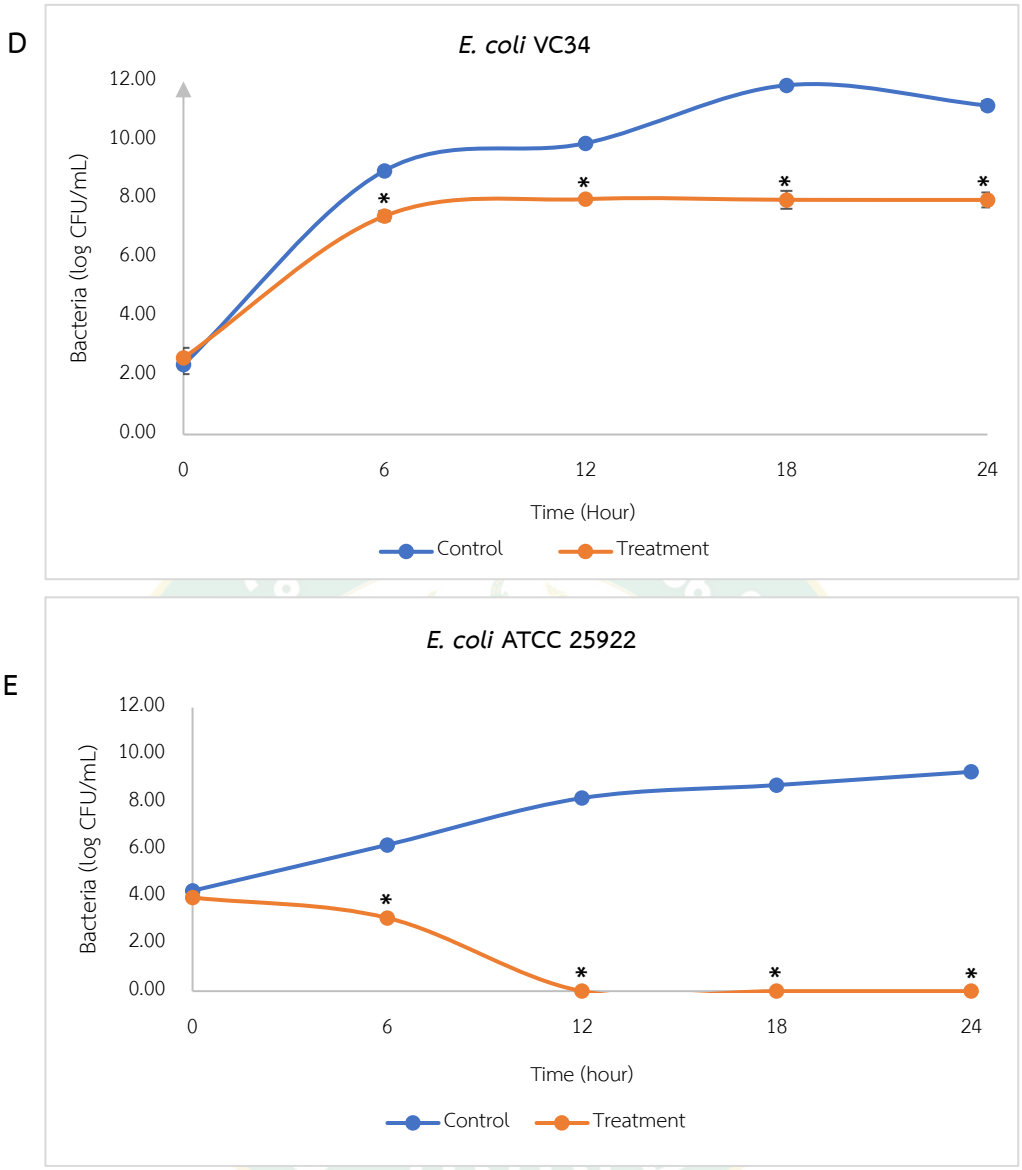

E. coli VC13
Bacteria (log CFU/mL)
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0
6
12
18
24
Time (Hour)
Control
Treatment

B


E. coli VC16
Bacteria (log CFU/mL)
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0
6
12
18
24
Time (Hour)
Control
Treatment

C


E. coli VC19
Bacteria (log CFU/mL)
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0
6
12
18
24
Time (hour)
Control
Treatment



ภาพที่ 12 กราฟประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (A, B, C และ D) และสายพันธุ์อ้างอิง ATCC 25922 (E)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการป้องกันเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกร *(in vivo)*

การศึกษาการใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในลูกสุกร *(in vivo)* ระยะเวลา 7 วัน โดยผ่านการอนุมัติขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์เลขที่ MACUC013A/2566 ได้ทำการทดสอบในลูกสุกรระยะดูดนมอายุ 7-14 วันโดยให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจที่มีความเข้มข้น 10^9 PFU/mL พบค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจทำให้จำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่พบได้ตามธรรมชาติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในวันที่ 7 ของการทดลอง

พบว่ากลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจทำให้เชื้อ *E. coli* ลดลงที่ 1.33 log-units เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Imklin et al. (2022) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในลูกสุกรอนุบาลพบว่า กลุ่มที่ให้แบคเทอริโอเฟจระดับ 2×10^9 PFU และ 2×10^{10} PFU ทำให้จำนวนเชื้อ *E. coli* ลดลงในวันที่ 4 ที่ 1.25 และ 1.58 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนวันที่ 10 เชื้อ *E. coli* ลดลงที่ 1.31 และ 2.2 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jamalludee et al. (2009) ได้รายงานว่าการให้แบคเทอริโอเฟจในการป้องกันและการรักษาสุกรที่กระตุ้นด้วยเชื้อ O149:H10:F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ในเวลาสั้นๆ แบคเทอริโอเฟจ 6 ชนิดถูกทดสอบในการป้องกันเชื้อได้ที่ระดับ 10^3 PFU/g จากอุจจาระ ถึงแม้จะไม่สูงมาก แต่การรักษาด้วยสารผสมแบคเทอริโอทำให้สุกรที่ติดเชื้อ *E. coli* ที่ท้องเสียมีอาการดีขึ้นและจำนวนเชื้อ *E. coli* ลดลงอย่างมากในอุจจาระ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Han et al. (2016) สุกรหลังหย่านมที่ถูกกระตุ้นด้วย enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 และ K99 โดยให้อาหารที่เสริมด้วยแบคเทอริโอ เฟจส่งผลให้น้ำหนักสุกรเพิ่มขึ้น ลดอาการท้องเสีย คะแนนอุจจาระดีขึ้น ทั้งยังช่วยลดการยึดเกาะของเชื้อ ETEC K88 มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งการรายงานของ Lee et al. (2016) แบคเทอริโอเฟจยังช่วยลดเชื้อ *Clostridium* spp. และ coliforms จากอุจจาระของสุกรในวันที่ 14 และ 21 และยังช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ *lactobacillus* spp. ในวันที่ 14 ของการทดลอง ส่วนการรายงานของ Cha et al. (2012) พบว่าการให้แบคเทอริโอเฟจร่วมกับอาหารพื้นฐานในระดับ 0.1% ช่วยลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ลงได้ประมาณ 60.73 ถึง 63.92% ในลูกสุกรหย่านม นอกจากนี้ แบคเทอริโอเฟจยังคุณสมบัติทำลายเชื้อก่อโรคชนิดอื่นอีกตามการรายงานของ Pelyuntha et al. (2021) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *Salmonella* พบว่าสารผสมแบคเทอริโอเฟจมีความสามารถลดเชื้อ *Salmonella* ได้ถึง 2.2–2.8 log unit ภายในเวลา 6 ชั่วโมงของการทดลอง และแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 ชนิด vB_SenS_KP001, vB_SenS_KP005 และ vB_SenS_WP110 ทำให้เชื้อในระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้อลดลงจาก 70 จนถึง 0% หลังจากวันที่ 4 ของการทดลอง ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าสารผสมแบคเทอริโอเฟจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่ช่วยลดเชื้อก่อโรคได้ซึ่งสามารถนำไปปรับปรุงใช้ตามความปลอดภัยของอาหารได้ (Pelyuntha et al., 2022) แบคเทอริโอเฟจถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อและผู้ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในทางการแพทย์ และมีแนวโน้มที่จะมีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการรักษามากที่สุด (Venturini et al., 2022)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* (log CFU/mL)

Day	Treatment		*p-value*
	Control	Bacteriophage	
1	4.47 ± 0.22^{d}	4.62 ± 0.26^{d}	0.527
3	4.30 ± 0.21^{c}	3.92 ± 0.12^{c}	0.279
5	4.11 ± 0.13^{b}	3.36 ± 0.17^{b}	0.393
7	4.29 ± 0.30^{Ba}	2.96 ± 0.10^{Aa}	0.049

$^{A, B}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแถวเดียวกัน ($p<0.05$)

$^{a, b}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกัน ($p<0.05$)

การประเมินคะแนนมูลสุกร (Fecal score)

จากการศึกษาความสามารถของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อลักษณะมูลในลูกสุกรที่อายุ 7-14 วันพบว่ากลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจทำให้ลักษณะคะแนนมูลสุกรดีขึ้นจากวันที่ 1 ที่เริ่มการทดลอง ($p>0.05$) ในวันที่ 1 และวันที่ 3 การให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจไม่ส่งผลต่อคะแนนมูลสุกร ($p>0.05$) แต่ในวันที่ 5 กลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจมีแนวโน้มทำให้คะแนนมูลสุกรดีขึ้นแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนวันที่ 7 กลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจส่งผลทำให้ลูกสุกรมีลักษณะมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจมีลักษณะมูลที่ได้คะแนนต่ำกว่าอยู่ที่คะแนน 0-1 คะแนนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jamalludeen et al. (2009) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจในลูกสุกรหย่านมที่ถูกทดสอบด้วยเชื้อ ETEC GJ280 พบว่ากลุ่มที่ให้แบคเทอริโอเฟจในการป้องกันการท้องเสียทำให้คะแนนมูลสุกรลดลงแสดงให้เห็นว่าอาการท้องเสียในลูกสุกรมีลักษณะที่ดีขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจ (GJ1, GJ2 และ GJ7) ช่วยลดอาการท้องเสียได้อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Kingkan et al. (2023) ได้ทำการศึกษาผลของสารผสมแบคเทอริโอเฟจในลูกสุกรระยะอนุบาลพบว่า กลุ่มที่ให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจ 1g/kg + amoxicillin (Amox-Phage) ไม่ส่งผลต่อคะแนนมูลสุกรในสัปดาห์ที่ 1-5 แต่ในสัปดาห์ที่ 6 กลับส่งผลต่อคะแนนมูลสุกรรองจากกลุ่มที่ให้ Amoxicillin + Colistin (Amox-Co) ส่วนงานวิจัยของ Lee et al. (2016) การแบ่งเป็นช่วงการทดลองพบว่าช่วงที่ 1 (วันที่ 0-7) พบแบคเทอริโอเฟจส่งผลต่อคะแนนมูลสุกร แต่ช่วงที่ 2-3 (วันที่ 8-21, 22-35) ไม่ส่งผลต่อคะแนนมูลสุกรทั้งยังไม่ส่งผลต่อ

fecal score moisture ตลอดการทดลอง (Yan et al., 2012) แตกต่างจากการศึกษาของ Kim et al. (2017) ได้ทำการศึกษาผลของสารผสมแบคเทอริโอเฟจและ multi-strain probiotics ในลูกสุกรระยะหย่านมที่พบว่าการทดลองที่ 1 ในช่วงที่ 1 (วันที่ 0-7) ของการทดลองไม่มีผลต่อคะแนนมูลสุกร แต่ในช่วงที่ 2-3 (วันที่ 8-21, 22-35) กลับมีผลต่อคะแนนมูลสุกรที่การเสริมแบคเทอริโอเฟจระดับ 1 และ 1.5g/kg ส่วนการทดลองที่ 2 พบความแตกต่างในช่วงที่ 2 (วันที่ 8-21) ของการทดลอง

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อลักษณะมูลในลูกสุกรที่อายุ 7-14 วัน

	Treatment		*P-value*
	Control	Bacteriophage	
Day 1	1.22±0.97	1.11±0.78^{d}	0.08
Day 3	1.44±0.73	0.89±0.60^{c}	0.07
Day 5	0.89±0.60	0.56±0.73^{b}	0.06
Day 7	1.56±0.73^{B}	0.33±0.71^{Aa}	<0.001

$^{A, B}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแถวเดียวกัน ($p<0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกัน ($p<0.05$)

0 = อุจจาระปกติ, 1 = อุจจาระอ่อนนุ่ม, 2 = อุจจาระอ่อนค่อนไปทางเหลว, 3 = อุจจาระเหลวเป็นน้ำ

การศึกษาสมรรถภาพการเจริญเติบโต

จากการศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในลูกสุกรที่อายุ 7 วัน พบว่าลูกสุกรที่ได้รับแบคเทอริโอเฟจมีน้ำหนักตัว (BWG) ที่มากกว่าเท่ากับ 1.63 กิโลกรัม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1.60 กิโลกรัมซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และลูกสุกรที่ได้รับแบคเทอริโอเฟจมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ที่มากกว่าเท่ากับ 233.02 กรัม/ตัว/วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 229.21 กรัม/ตัว/วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Won et al. (2021) ได้ทำการศึกษาผลของแบคเทอริโอเฟจในลูกสุกรระยะหย่านมส่งผลให้ BWG และ ADG ในวันที่ 1-7 ของการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ในวันที่ 7-14 กลับมีผลทางสถิติโดยเฉพาะกลุ่ม C ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* และทำการรักษาด้วยแบคเทอริโอเฟจในระดับ 10^{9} PFU/gm ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Hosseindoust et al. (2017) ที่ทำการศึกษาสารผสมแบคเทอริโอเฟจเพื่อทดแทน zinc oxide หรือ organic acids ในการควบคุมอาการท้องเสียและ

ปรับปรุงประสิทธิภาพของลูกสุกรหย่านมพบว่ากลุ่มที่ให้แบคเทอริโอเฟจส่งผลให้ ADG สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ในสองช่วงการทดลอง (วันที่ 0-7 และ 8-21) ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในลำไส้ ดังนั้นจึงอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมแทน zinc oxide ที่สอดคล้องกับการรายงานของ Lee et al. (2016) ในการเสริมแบคเทอริโอเฟจระดับ 1g/kg ส่งผลทำให้ BWG และ ADG เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นการให้สารผสมแบคเทอริโอเฟจในลูกสุกรไม่ส่งผลต่ออัตราน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทั้งยังไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจต่อการเจริญเติบโตในลูกสุกรที่อายุ 7-14 วัน

	Treatment		*p-value*
	Control	**Bacteriophage**	
BWG (Kg)	1.60±0.50	1.63±1.42	0.7843
ADG (g/d)	229.21±1.40	233.02±1.35	0.9456

BWG = body weight gain (น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น)

ADG = average daily gain (อัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* 50 isolates มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Amoxicillin สูงที่สุด 100% และมากกว่า 50% ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด และแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 ชนิดสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ได้ โดยแบคเทอริโอเฟจชนิด WPEC2 สามารถทำลายเชื้อได้สูงที่สุด 64% เมื่อพัฒนาเป็นสารผสมแบคเทอริโอเฟจมีความสามารถในการทำลายเชื้อได้ที่ 6-24 ชั่วโมง ในหลอดทดลอง และการใช้สารผสมแบคเทอริโอเฟจที่ความเข้มข้น 10^9 PFU/mL ทำให้เชื้อ *E. coli* ในอุจจาระของลูกสุกรลดลง 1.33 log-units ในวันที่ 7 ทั้งยังทำให้ลักษณะคะแนนมูลสุกรต่ำกว่าอยู่ที่ 0-1 คะแนน นอกจากนี้สารผสมแบคเทอริโอเฟจยังส่งผลให้ BWG และ ADG สูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถนำมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ แต่อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมของอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อความสะดวกในการใช้งานต่อไป

บรรณานุกรม

กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2537. การควบคุมป้องกันโรคสุกรที่สำคัญในประเทศไทย. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. น. 11-15.

ใจพร พุ่มคำ. 2561. อาหาร (ไม่) ปลอดภัย. ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. **วารสารอาหารและยา** 19(3).

ณัฐธิดา สุขสาย, ณัฐพร รัฐบารุง, พักตร์วิภา สุวรรณพรหม และหทัยกาญจน์, เชาวนพูนผล. 2559. การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์: กรณีศึกษาจังหวัดเชียงใหม่. **วารสารเภสัชกรรมไทย**, 8(2).

นริศร นางาม และเสรี แข็งแอ. 2553. การแยกหาฟาจจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่อรักษาและป้องกันโรคจากเชื้อ ***Escherichia coli*** **(colibacillosis)** ในไก่เนื้อ. ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิตยา ค้าคุ้ม,อุมาพร ยอดประทุม และรศนา วงศ์รัตนชีวิน. 2553. แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 25(1), 47-53.

ปริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศึกดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. 2562. แบคเทอริโอเฟจ: ชีววิทยาและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 21(3).

เตชภณ ทรงผาสุข. 2564. การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจต่อการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโคไลบาซิลโลซิสในทางเดินอาหารสุกร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชรินทร์ ศิริงาน. 2564. การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจไลติกของเชื้อแซลโมเนลลาเพื่อใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, สำนักวิชาเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วรรณพร ทะพิงค์แก. 2557. ทางเลือกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตสำหรับปศุสัตว์. **วารสารเกษตร** 30(2): 201–212.

วัลลภา หนุนภักดี. 2550. โรคท้องเสียในลูกสุกรที่เกิดจากเชื้อ *E.coli*. **วารสารข่าวปศุสัตว์,** 29(263), (33-34).

สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. 2565. สถานการณ์สินค้าสุกร และแนวโน้มปี 2566. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรม กรมศุลกากร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.swine-thailand.com

สุกิจ ติดชัย. 2551. คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่องการผลิตและการจัดการสุกร (Swine production and management). สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อภิญญา นามสาย. 2560. Bacteriophage: Phage application. **วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา**

องค์การเภสัชกรรม, 24(2).

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, สถิตย์ พันวิไล, จรัญ ประจันบาล และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2563. จุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญ. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้**, 11(1), 188.

Ackermann, H. W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, 154(4), 245-251.

Amarillas, L., Rubí-Rangel, L., Chaidez, C., González-Robles, A., Lightbourn-Rojas, L. & León-Félix, J. 2017. Isolation and Characterization of phiLLS, a Novel Phage with Potential Biocontrol Agent against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, 8(1355).

American society for microbiology. 2022. **Phage Therapy: Past, Present and Future.**

Arsène, M. M. J., Davares, A. K. L., Viktorovna, P. I., Andreevna, S. L., Sarra, S., Khelifi, I. & Sergueïevna, D. M. 2022. The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions. **Vet World**, 15(3), 662-671.

Batinovic, S., Wassef, Knowler, S., Rice, Stanton, Rose, Tucci, Nittami, T., Vinh, Drummond, Sobey, Chan, Seviour, R., Petrovski, S. & Franks, A. 2019. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. **Pathogens**, 8(100).

Cha, S. B., Yoo, A. N., Lee, W. J., Shin, M. K., Jung, M. H., Shin, S. W., Cho, Y. W. & Yoo, H. S. 2012. Effect of bacteriophage in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infected pigs. **J Vet Med Sci**, 74(8), 1037-1039.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing., 29th ed., n.p.

Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Barekzi, N. 2017. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. **Viruses**, 9(3).

Gaborieau, B. & Debarbieux, L. 2023. The role of the animal host in the management of bacteriophage resistance during phage therapy. **Current Opinion in Virology**, 58(101290).

Han, S.-J., Oh, Y., Lee, C. & Han, J.-H. 2016. Efficacy of dietary supplementation of bacteriophages in treatment of concurrent infections with enterotoxigenic

Escherichia coli K88 and K99 in postweaning pigs. **Journal of Swine Health and Production**, 24(259-263).

Hosseindoust, A., Lee, S. H., Kim, J. S., Choi, Y.-H., Noh, H. S., Lee, J. H., Jha, P. K., Kwon, I. K. & Chae, B.-J. 2017. Dietary bacteriophages as an alternative for zinc oxide or organic acids to control diarrhoea and improve the performance of weanling piglets. **Veterinarni Medicina**, 62(53-61).

Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M. & Donoghue, A. M. 2004. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. **Poult Sci**, 83(12), 1944-1947.

Imklin, N., Sriprasong, P., Phuttapatimok, S., Kaminsonsakul, T., Woonwong, Y., Jirawattanapong, P., Lekcharoensuk, P., Thanantong, N. & Nasanit, R. 2022. In vivo assessment of bacteriophages specific to multidrug resistant *Escherichia coli* on fecal bacterial counts and microbiome in nursery pigs. **Research in Veterinary Science**, 151(138-148).

Iowa state University. 2021. Colibacillosis (*E. coli* diarrhea). **Department of Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine College of Veterinary Medicine**.

Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Shewen, P. E. & Gyles, C. L. 2009. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs. **Vet Microbiol**, 136(1-2), 135-141.

Jeffrey, J. Z., Locke, A. K., Alejandro, R., Kent, J. S., Gregory, W. S. & Jianqiang, Z. 2019. **Diseases of Swine**. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Kim, J. S., Hosseindoust, A., Lee, S. H., Choi, Y. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Kwon, I. K. & Chae, B. J. 2017. Bacteriophage cocktail and multi-strain probiotics in the feed for weanling pigs: effects on intestine morphology and targeted intestinal coliforms and *Clostridium*. **Animal**, 11(1), 45-53.

Kim, K. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Lee, S. H., Lee, J. H., Kwon, I. K. & Chae, B. J. 2014. Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. **Animal Feed Science and Technology**, 196(88-95).

Kingkan, P., Supcharoenkul, T., Rakangthong, C., Bunchasak, C., Surachat, K. & Loongyai,

W. 2023. Effect of Bacteriophages on Intestinal Colonization of *Escherichia coli*, Cecal Microbiota Composition, Intestinal Morphology, and Growth Performance in Nursery Pigs from Commercial Pig Farms. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, 11.

Lee, S., Hosseindoust, A., Goel, A., Choi, Y., Kwon, I. K. & Chae, B. 2016. Effects of dietary supplementation of bacteriophage with or without zinc oxide on the performance and gut development of weanling pigs. **Italian Journal of Animal Science**, 15(3), 412-418.

Lee, S. H., Hosseindoust, A. R., Kim, J. S., Choi, Y. H., Lee, J. H., Kwon, I. K. & Chae, B. J. 2016. Bacteriophages as a promising anti-pathogenic option in creep-feed for suckling piglets: Targeted to control *Clostridium* spp. and coliforms faecal shedding. **Livestock Science**, 191(161-164).

Luppi, A., Bonilauri, P., Dottori, M., Gherpelli, Y., Biasi, G., Merialdi, G., Maioli, G. & Martelli, P. 2015. Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy. **Transbound Emerg Dis**, 62(1), 67-71.

Mirzaei, M. K. & Nilsson, A. S. 2015. Correction: Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. **PLOS ONE**, 10(5), e0127606.

Mitchaothai, J. & Srikijkasemwat, K. 2022. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from different pig production systems. **Anim Biosci**, 35(1), 138-146.

Nguyet, L. T. Y., Keeratikunakorn, K., Kaeoket, K. & Ngamwongsatit, N. 2022. Antibiotic resistant *Escherichia coli* from diarrheic piglets from pig farms in Thailand that harbor colistin-resistant mcr genes. **Scientific Reports**, 12(1), 9083.

Niu, Y. D., Liu, H., Du, H., Meng, R., Sayed Mahmoud, E., Wang, G., McAllister, T. A. & Stanford, K. 2021. Efficacy of Individual Bacteriophages Does Not Predict Efficacy of Bacteriophage Cocktails for Control of *Escherichia coli* O157. **Front Microbiol**, 12(616712).

O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Coffey, A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol**, 70(6), 3417-3424.

Pelyuntha, W., Ngasaman, R., Yingkajorn, M., Chukiatsiri, K., Benjakul, S. & Vongkamjan, K.

2021. Isolation and Characterization of Potential *Salmonella* Phages Targeting Multidrug-Resistant and Major Serovars of Salmonella Derived From Broiler Production Chain in Thailand. **Frontiers in Microbiology**, 12.

Pelyuntha, W., Yafa, A., Ngasaman, R., Yingkajorn, M., Chukiatsiri, K., Champoochana, N. & Vongkamjan, K. 2022. Oral Administration of a Phage Cocktail to Reduce *Salmonella* Colonization in Broiler Gastrointestinal Tract-A Pilot Study. **Animals (Basel)**, 12(22).

Pérez-Calvo, E., Wicaksono, A. N., Canet, E., Daulton, E., Ens, W., Hoeller, U., Verlhac, V., Celi, P. & Covington, J. A. 2019. The measurement of volatile organic compounds in faeces of piglets as a tool to assess gastrointestinal functionality. **Biosystems Engineering**, 184(122-129).

Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A. I. M. & Vongkamjan, K. 2019. Lysis Profiles of Salmonella Phages on *Salmonella* Isolates from Various Sources and Efficiency of a Phage Cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. **Microorganisms**, 7(4).

Ringseis, R. & Eder, K. 2022. Heat stress in pigs and broilers: role of gut dysbiosis in the impairment of the gut-liver axis and restoration of these effects by probiotics, prebiotics and synbiotics. **Journal of Animal Science & Biotechnology**, 13(1), 1-16.

Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F. & Letellier, A. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 59(1), 31.

Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V. & De Paepe, M. 2020. New insights into intestinal phages. **Mucosal Immunol**, 13(2), 205-215.

Singh, S., Dhanjal, D. S., Sonali, Thotapalli, S., Kumar, V., Datta, S., Kumar, V., Kumar, M. & Singh, J. 2020. An insight in bacteriophage based biosensors with focus on their detection methods and recent advancements. **Environmental Technology & Innovation**, 20(101081).

Smith, H. W. & Huggins, M. B. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. **Gen Microbiol**, 128(2), 307-318.

Songphasuk, T., Imklin, N., Sriprasong, P., Woonwong, Y., Nasanit, R. & Sajapitak, S. 2022. Bacteriophage efficacy in controlling swine enteric colibacillosis pathogens: An in vitro study. **Vet World**, 15(12), 2822-2829.

Ström, G., Halje, M., Karlsson, D., Jiwakanon, J., Pringle, M., Fernström, L. L. & Magnusson, U. 2017. Antimicrobial use and antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* on small- and medium-scale pig farms in north-eastern Thailand. **Antimicrob Resist Infect Control**, 6(75).

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G., Jr. 2001. Bacteriophage therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(3), 649-659.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris Jr, J. G. 2001. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 45(3), 649-659.

Taylor, D. J. 1986. **Pig disease**. 4th. Burlington.

Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S. & Iredell, J. 2022. Biological foundations of successful bacteriophage therapy. **EMBO Mol Med**, 14(7), e12435.

Won, Y. K., Kim, S. J. & Han, J. H. 2021. The protective effect of dietary supplementation of *Salmonella*-specific bacteriophages in post-weaning piglets challenged with *Salmonella typhimurium*. **J Adv Vet Anim Res**, 8(3), 440-447.

World Animal Protection. 2022. **EU bans the routine use of antibiotics in farmed animals.**

World Health Organization. 2021. **Antimicrobial resistance.**

Xiao, T., Zhu, X., Wang, W., Jia, X., Guo, C., Wang, X. & Hao, Z. 2023. A novel lytic bacteriophage against colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from different animals. **Virus Res**, 329(199090).

Yamaki, S., Omachi, T., Kawai, Y. & Yamazaki, K. 2014. Characterization of a novel *Morganella morganii* bacteriophage FSP1 isolated from river water. **FEMS Microbiol Lett**, 359(2), 166-172.

Yan, L., Hong, S. M. & Kim, I. H. 2012. Effect of bacteriophage supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in growing pigs. **Asian-Australas J Anim Sci**, 25(10), 1451-1456.

Yan, L., Meng, Q. W. & Kim, I. H. 2012. Effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in weanling pigs. **Livestock Science**, 145(1-3), 189-195.

Yordpratum, U., Tattawasart, U., Wongratanacheewin, S. & Sermswan, R. W. 2011. Novel lytic bacteriophages from soil that lyse *Burkholderia pseudomallei*. **FEMS Microbiol Lett**, 314(1), 81-88.

Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J. & Stevenson, G. W. 2012. **Diseases of swine**. 10th. Wiley-Blackwell.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียม Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4

สารเคมีประกอบด้วย	NaCl	8 g
	KCl	0.2 g
	Na_2HPO_4	1.44 g
	KH_2PO_4	0.24 g
	Distilled water	1000 ml

วิธีเตรียม ชั่งสารเคมีข้างต้นนำไปละลายในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB)

ชั่ง EMB ปริมาณ 37.46 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20 ml ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)

ชั่ง TSA ปริมาณ 40 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20 ml ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.3. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar (MHA)

ชั่ง MHA ปริมาณ 38 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20 ml ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.4. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)

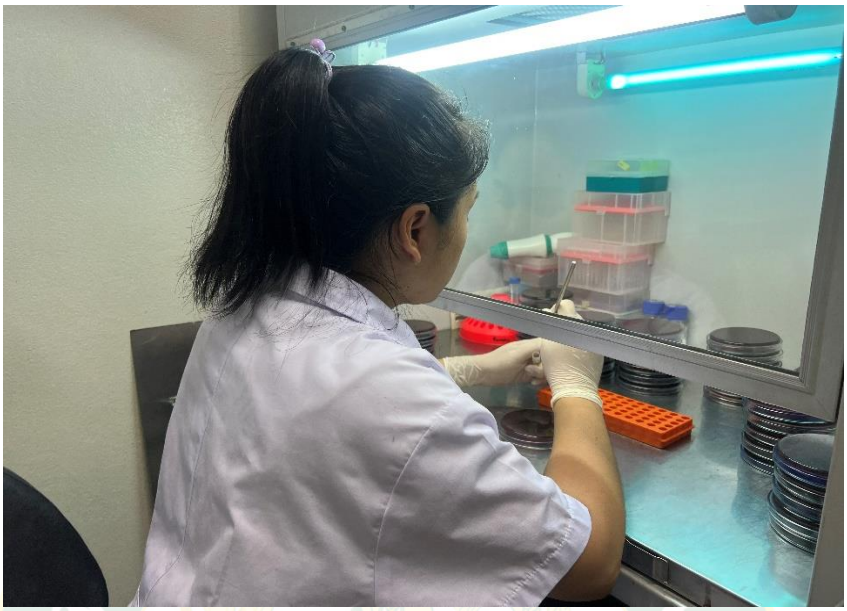
ชั่ง TSB ปริมาณ 30 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงดูดใส่หลอดทดลองประมาณ 9 ml แล้วปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.5. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered peptone water (BPW)

ชั่ง BPW ปริมาณ 20.07 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็นจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

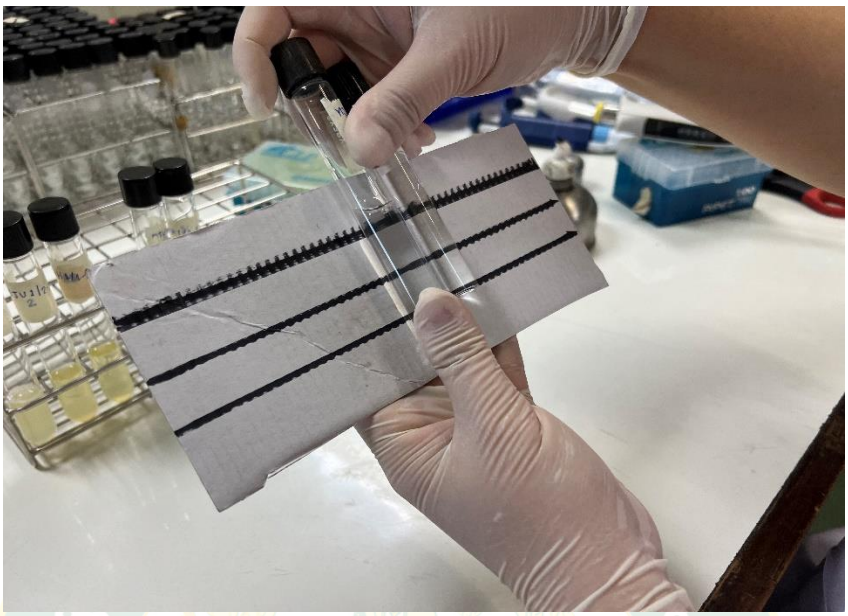
ภาคผนวก ข

การปฏิบัติการทดลอง

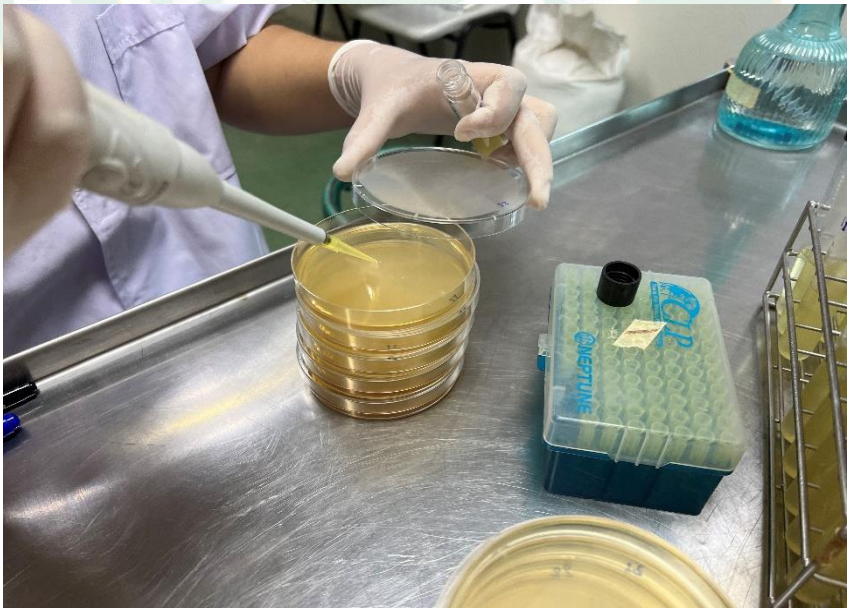


ภาพที่ 13 การเตรียมเชื้อ *E. coli*

ภาพที่ 14 การทดสอบยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *E. coli*

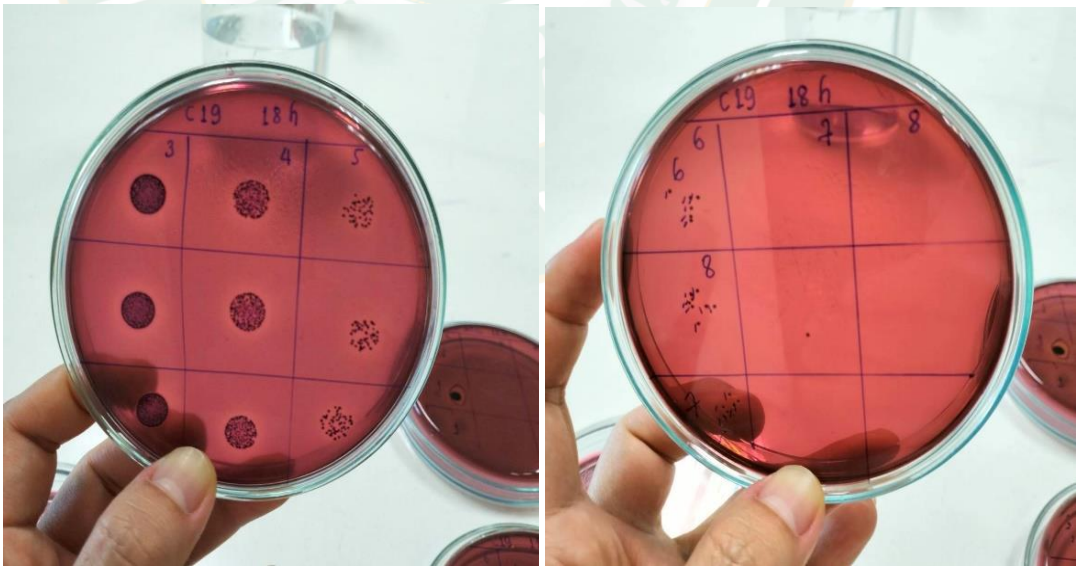


ภาพที่ 15 การปรับความขุ่น 0.5 McFarland ด้วยวิธี manual



ภาพที่ 16 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจ (host-range)

ภาพที่ 17 การทดสอบ bacteriophage cocktail ในหลอดทดลอง

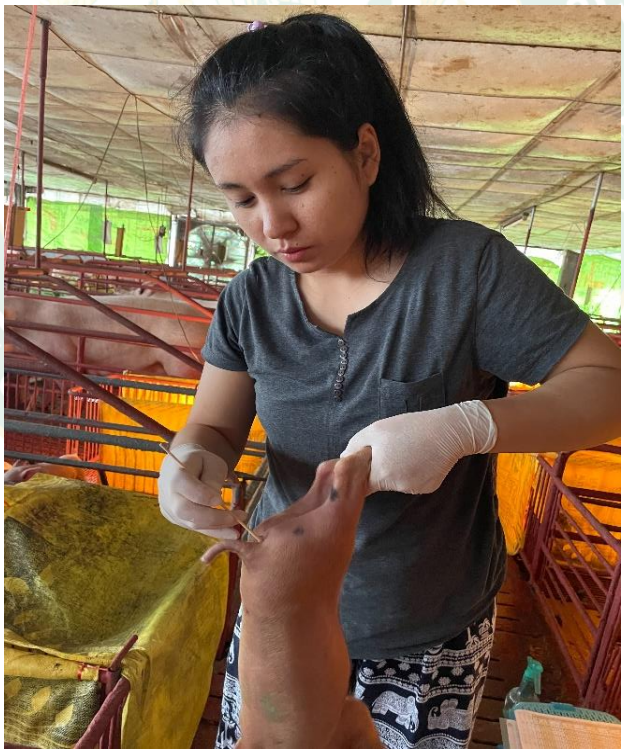


ภาพที่ 18 การทดสอบ bacteriophage cocktail ในหลอดทดลองทุก 6 ชั่วโมง

ภาพที่ 19 การทำเครื่องหมายลูกสุกร

ภาพที่ 20 การป้อน PBS และ bacteriophage cocktail ให้ลูกสุกร

ภาพที่ 21 การชั่งน้ำหนักลูกสุกร



ภาพที่ 22 การ swab ทวารของลูกสุกร

ภาพที่ 23 การ dilute ตัวอย่าง

ภาพที่ 24 เทคนิคการ pour plate

ตารางที่ 8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดต่อเชื้อ *E. coli*

E. coli 50 isolates	Antibiotics								Antibiotic resistance	Percent resistance
	Cephalosporin	Quinolones	Sulfonamide	Tetracycline	Aminoglycoside		Penicillin	Polypeptide		
	CL	ENR	SXT	OT	N	CN	AML	CT		
VC1	R	S	R	R	R	S	R	I	5/8	62.50
VC2	I	R	S	R	R	S	R	I	4/8	50.00
VC3	I	R	R	R	R	R	R	R	7/8	87.50
VC4	I	R	R	R	R	I	R	I	5/8	62.50
VC5	I	R	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC6	S	R	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC7	I	S	S	S	S	R	R	I	2/8	25.00
VC8	S	R	R	S	I	S	R	I	3/8	37.50
VC9	I	S	R	R	I	S	R	R	4/8	50.00
VC10	I	R	R	R	R	R	R	R	7/8	87.50
VC11	I	R	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC12	I	R	I	R	R	S	R	I	4/8	50.00
VC13	R	R	R	R	R	R	R	I	7/8	87.50

S = Susceptibility, I = Intermediate และ R = Resistance

CL = Cephalexin, ENR = Enrofloxacin, SXT = Sulfamethoxazole-trimethoprim, OT = Oxytetracycline, N = Neomycin, CN = Gentamicin, AML = Amoxycillin และ CT = Colistin

ตารางที่ 8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดต่อเชื้อ *E. coli* (ต่อ)

E. coli 50 isolates	Antibiotics								Antibiotic resistance	Percent resistance
	Cephalosporin	Quinolones	Sulfonamide	Tetracycline	Aminoglycoside		Penicillin	Polypeptide		
	CL	ENR	SXT	OT	N	CN	AML	CT		
VC14	R	S	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC15	R	I	S	R	R	R	R	I	5/8	62.50
VC16	R	R	R	R	R	R	R	I	7/8	87.50
VC17	R	R	R	R	R	R	R	I	7/8	87.50
VC18	I	S	S	R	R	S	R	R	4/8	50.00
VC19	R	S	S	R	R	R	R	R	6/8	75.00
VC20	S	S	R	R	R	R	R	R	6/8	75.00
VC21	R	R	R	R	R	I	R	I	6/8	75.00
VC22	R	R	R	R	R	R	R	R	8/8	100.00
VC23	R	R	R	R	R	R	R	I	7/8	87.50
VC24	R	R	R	R	R	I	R	R	7/8	87.50
VC25	R	S	R	R	R	I	R	I	5/8	62.50
VC26	R	S	R	R	R	I	R	I	5/8	62.50

S = Susceptibility, I = Intermediate และ R = Resistance

CL = Cephalexin, ENR = Enrofloxacin, SXT = Sulfamethoxazole-trimethoprim, OT = Oxytetracycline, N = Neomycin, CN = Gentamicin, AML = Amoxycillin และ CT = Colistin

ตารางที่ 8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดต่อเชื้อ *E. coli* (ต่อ)

E. coli 50 isolates	Antibiotics								Antibiotic resistance	Percent resistance
	Cephalosporin	Quinolones	Sulfonamide	Tetracycline	Aminoglycoside		Penicillin	Polypeptide		
	CL	ENR	SXT	OT	N	CN	AML	CT		
VC27	I	S	S	R	R	I	R	I	3/8	37.50
VC28	R	S	S	R	R	I	R	R	5/8	62.50
VC29	I	S	R	R	R	R	R	I	5/8	62.50
VC30	S	S	R	R	R	R	R	I	5/8	62.50
VC31	I	I	S	R	R	I	R	I	3/8	37.50
VC32	R	R	S	S	R	I	R	I	4/8	50.00
VC33	R	S	R	R	R	R	R	R	7/8	87.50
VC34	R	R	R	R	R	R	R	I	7/8	87.50
VC35	R	S	R	R	R	S	R	I	5/8	62.50
VC36	I	R	R	R	R	I	R	I	5/8	62.50
VC37	I	I	S	R	R	I	R	I	3/8	37.50
VC38	I	S	R	R	R	R	R	R	6/8	75.00
VC39	R	S	R	R	R	R	R	R	7/8	87.50

S = Susceptibility, I = Intermediate และ R = Resistance

CL = Cephalexin, ENR = Enrofloxacin, SXT = Sulfamethoxazole-trimethoprim, OT = Oxytetracycline, N = Neomycin, CN = Gentamicin, AML = Amoxycillin และ CT = Colistin

ตารางที่ 8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดต่อเชื้อ *E. coli* (ต่อ)

E. coli 50 isolates	Antibiotics								Antibiotic resistance	Percent resistance
	Cephalosporin	Quinolones	Sulfonamide	Tetracycline	Aminoglycoside		Penicillin	Polypeptide		
	CL	ENR	SXT	OT	N	CN	AML	CT		
VC40	R	S	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC41	I	R	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC42	I	R	R	R	R	I	R	I	5/8	62.50
VC43	R	S	I	R	R	I	R	I	4/8	50.00
VC44	R	S	S	R	R	I	R	I	4/8	50.00
VC45	R	S	R	R	R	I	R	R	6/8	75.00
VC46	I	S	S	R	R	R	R	I	4/8	50.00
VC47	R	S	I	R	R	R	R	R	6/8	75.00
VC48	R	S	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC49	R	S	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
VC50	R	S	R	R	R	R	R	I	6/8	75.00
Percent	**54**	**42**	**70**	**94**	**94**	**56**	**100**	**28**		

S = Susceptibility, I = Intermediate และ R = Resistance

CL = Cephalexin, ENR = Enrofloxacin, SXT = Sulfamethoxazole-trimethoprim, OT = Oxytetracycline, N = Neomycin, CN = Gentamicin, AML = Amoxycillin และ CT = Colistin

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจจำแนกตามความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli*

E. coli 50	Bacteriophages				
isolates	WPEC1	WPEC2	WPEC3	WPEC4	WPEC5
VC1	-	-	+	-	+
VC2	-	-	-	-	-
VC3	+	+	+	+	+
VC4	-	+	+	-	+
VC5	++	++	++	++	++
VC6	+	+	-	+	-
VC7	+	+	-	+	+
VC8	-	-	+	-	-
VC9	-	-	+	+	-
VC10	-	+	-	+	-
VC11	-	-	+	+	+
VC12	+	+	+	+	+
VC13	-	+	++	+	+
VC14	+	+	+	+	++
VC15	+	+	++	+	++
VC16	-	+	+	-	+
VC17	+	+	+	-	+
VC18	+++	+++	+++	++	+++
VC19	+++	+++	+++	+++	+++
VC20	-	+++	+++	+	+
VC21	-	+	-	+	+++
VC22	-	-	+	-	-
VC23	+	+	+	+	+
VC24	-	+	-	-	+
VC25	-	-	+	+	-
VC26	-	-	+	-	-

+++ คือเกิดวงใสทั้งหมด ++ คือเกิดวงใสบางส่วน + คือเกิดวงใสเล็กน้อย และ – คือไม่พบวงใส

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอเฟจจำแนกตามความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* (ต่อ)

E. coli 50	Bacteriophages				
isolates	WPEC1	WPEC2	WPEC3	WPEC4	WPEC5
VC27	+	+	+	-	-
VC28	-	-	-	-	-
VC29	++	+++	+	+	-
VC30	+	+++	+	+	-
VC31	+	+	+	+	+
VC32	+	-	-	-	-
VC33	+	+	-	-	-
VC34	+	+	+	+	-
VC35	++	+++	+	+	++
VC36	-	-	-	-	-
VC37	-	-	+	-	-
VC38	-	+	-	-	-
VC39	-	-	-	-	-
VC40	+	+	-	+	-
VC41	-	-	-	-	-
VC42	-	+	-	+	-
VC43	-	-	+	+	+
VC44	-	+	-	+	-
VC45	-	-	-	-	-
VC46	-	-	-	-	-
VC47	+	+	+	+	+
VC48	-	-	-	-	-
VC49	++	+++	+	-	+
VC50	+++	+++	-	-	+++
%lysis	**46.00**	**64.00**	**60.00**	**54.00**	**48.00**

+++ คือเกิดวงใสทั้งหมด ++ คือเกิดวงใสบางส่วน + คือเกิดวงใสเล็กน้อย และ – คือไม่พบวงใส

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของสารผสมแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *E. coli* ที่เป็นตัวแทนการดื้อยาปฏิชีวนะ

E. coli strains	Time (hr.)	Bacteria count (log CFU/mL)	
		Control	Bacteriophage
VC16	0	2.04 ± 0.056^{Ba}	3.68 ± 0.032^{Aa}
	6	8.53 ± 0.099^{Bb}	5.48 ± 0.170^{Ab}
	12	8.98 ± 0.186^{Bc}	5.59 ± 0.024^{Ac}
	18	9.09 ± 0.121^{Bd}	7.40 ± 0.110^{Ad}
	24	9.35 ± 0.494^{Be}	8.36 ± 0.081^{Ae}
VC13	0	1.67 ± 0.185^{Ba}	1.56 ± 0.241^{Aa}
	6	8.10 ± 0.069^{Bb}	6.26 ± 0.241^{Ab}
	12	9.20 ± 0.027^{Bc}	6.83 ± 0.128^{Ac}
	18	8.92 ± 0.063^{Bd}	7.80 ± 0.084^{Ad}
	24	9.45 ± 0.031^{Be}	9.29 ± 0.013^{Ae}
VC19	0	4.13 ± 0.050^{Ba}	3.88 ± 0.091^{Aa}
	6	8.74 ± 0.126^{Bb}	4.10 ± 0.174^{Ab}
	12	8.77 ± 0.118^{Bb}	4.20 ± 0.174^{Ab}
	18	8.84 ± 0.063^{Bc}	6.57 ± 0.041^{Ac}
	24	9.33 ± 0.109^{Bd}	8.25 ± 0.024^{Ad}
VC34	0	2.28 ± 0.28^{Ba}	2.46 ± 0.35^{Aa}
	6	8.96 ± 0.10^{Bb}	7.42 ± 0.17^{Ab}
	12	9.90 ± 0.10^{Bc}	8.00 ± 0.07^{Ac}
	18	11.87 ± 0.05^{Be}	7.97 ± 0.30^{Ae}
	24	11.18 ± 0.15^{Bd}	7.97 ± 0.25^{Ad}
E. coli ATCC 25922	0	4.25 ± 0.09^{Ba}	3.96 ± 0.10^{Aa}
	6	6.19 ± 0.03^{Bb}	3.10 ± 0.17^{Ab}
	12	8.17 ± 0.16^{Bc}	0.00 ± 0.00^{Ac}
	18	8.72 ± 0.12^{Be}	0.00 ± 0.00^{Ae}
	24	9.28 ± 0.04^{Bd}	0.00 ± 0.00^{Ad}

$^{A, B}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแถวเดียวกัน ($p<0.05$)

$^{a-e}$ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกัน ($p<0.05$)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	Mrs. Viphavanh Chanthavong
เกิดเมื่อ	25 April 1991
ประวัติการศึกษา	Graduated bachelor degree from National University of Laos Lao P.D.R. in 2013 majoring is Veterinary Medicine
ประวัติการทำงาน	Work at Faculty of Agriculture and Environment, Savannakhet University, Lao P.D.R from 2013 to present

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY