

การศึกษาทางเลือกอื่นเพื่อทดแทนการใช้ยาโคลิสตินผสมในอาหารสัตว์ในฟาร์มสุกรเพื่อรักษาอาการท้องเสีย
เนื่องจากการติดเชื้อ อี. โคไล. (*E. coli*) ในลูกสุกรอนุบาล

(A Study investigating alternative regimens to replace colistin mixed in feed for the treatment of *E. coli* infection in nursery pigs)

รักไทย งามภักดี¹, สุนิตย์ มีบำรุง², ภาณุมาศ คงปันนา², เดชฤทธิ์ นิลอุบล²

บทคัดย่อ

การใช้ยาโคลิสตินในลูกสุกรท่านมเพื่อลดปัญหาท้องเสีย รวมไปถึงการสูญเสีย ในช่วง 2 สัปดาห์แรกอาจเป็นสาเหตุให้เกิดเชื้อดื้อยาได้ วัตถุประสงค์งานวิจัยเพื่อศึกษาสารเสริมทดแทนยาโคลิสติน ในลูกสุกรท่านม จำนวน 222 ตัว ($n=37$) อายุ 24 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 6.19 ± 0.63 kg แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) อาหารงานวิจัย มี 6 กลุ่ม ได้แก่ อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 1.อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย colistin 160 ppm กลุ่มที่ 2.อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย bromelain 12.5 mg/ton กลุ่มที่ 3.อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย 1 kg apramycin และ 125 mg flavomycin กลุ่มที่ 4. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย CuSO₄ 3kg/ton กลุ่มที่ 5.อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย butyric acid 1 kg/ton และ yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 1 kg/ton กลุ่มที่ 6.อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย probiotic (*Bacillus subtilis*) 1.2 kg/ton ผลการทดลองด้านสมรรถภาพการเจริญเติบโต พบร่วมค่า ADG (กรัม/ตัว/วัน) ในกลุ่ม T4 T5 และ T6 มีค่าสูงที่สุด ($p<0.01$) นอกจากนี้ T4 และ T6 มีค่าน้ำหนักสุดท้ายในวันที่ 14 ที่สูงที่สุดเช่นกัน ($p<0.01$) ผลด้านจำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูล ($\log 10$ cfu/g) พบร่วมวันที่ 14 กลุ่ม T1 T2 และ T6 มีค่าเชื้อ *E.coli* ในมูลน้อยที่สุด ($p<0.01$) และช่วงการเปลี่ยนแปลงวันที่ 0 และ 14 ส่งผลต่อเชื้อ *E.coli* ในมูลที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ผลด้านร้อยละของสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย พบร่วมทุกกลุ่มอาหารทดลองสามารถลดอาการท้องเสียได้จากวันที่ 0 ถึง 14 นอกจากนี้ในวันที่ 7 พบร่วม T2 และ T6 มีคาร้อยละของสุกรที่แสดงอาการท้องเสียที่น้อยที่สุด ($p<0.05$) สรุปงานทดลองอาหารทั้ง 5 กลุ่ม (T2-T6) สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมทดแทนยาโคลิสตินได้ โดยมีคุณสมบัติที่เพิ่มสมรรถภาพการผลิต ทั้งด้านการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลชีพก่ออาการท้องเสีย และอาการท้องเสียที่แสดง

คำสำคัญ: สารเสริมทดแทน ยาปฏิชีวนะ สุกรท่านม ประสิทธิภาพการผลิต อาการท้องเสีย

ทะเบียนวิชาการเลขที่: 63 (2)-0322-033

¹กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

A Study investigating alternative regimens to replace colistin mixed in feed for the treatment of *E.coli* infection in nursery pigs

Rakthai Ngampak¹, Sunit Mebumroonng², Panumas Kongpanna², Dachrit Nilubol²

Abstract

Antibiotics, often supplemented in feed, used as treatment and prevention of diarrhea disorders caused as well as mortality associated with this disease by post-weaning diarrhea (PWD) and consequently increases antibiotic resistance. The objective of this study was to evaluate the alternative feed additive in weaning pigs. Two-hundred twenty two pigs ((Landrace x Large white) x Duroc) with an average body weight (BW) of 6.19 ± 0.63 kg (24 days of age). A CRD design was conducted, composed of basal diet with supplementation for six experimental diet: (T1) colistin 160 ppm, (T2) 12.5mg of bromelain, (T3) 1kg of apramycin and 125 mg of flavomycin, (T4) 3 kg of CuSO₄, (T5) 1 kg of butyric acid and 1 kg of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and (T6) 1.2 kg of probiotics (*Bacillus subtilis*). The results of growth performance indicated ADG (g/head/d) were significantly higher in T4, T5 and T6 ($p<0.01$). Especially, T4 and T6 also had significantly higher final BW ($p<0.01$). Fecal *E. coli* (log cfu/g) of T1, T2 and T6 were significantly higher ($p<0.01$). Chronically, all of treatment effectively significantly decreased the fecal *E.coli* ($p<0.01$) as well as % diarrhea incident. There was effect of treatment on % diarrhea incident at day 14 of age ($p<0.05$). T2 and T6 revealed the lowest in % diarrhea incident ($p<0.05$). In summary, supplementation of antibiotics replacements and probiotics to weaned pigs (T2-T6) showed their property such benefit on performance, shift of gastro-pathogenic population and diarrhea incident.

Keywords: feed additive, antibiotics, weaning pig, growth performance, diarrhea

Research Paper No: 63 (2)-0322-033

¹ Division of Animal Feed and Veterinary Products Control, Department of Livestock Development

²Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทนำ

วงจรการผลิตสุกร (life cycle production) ของสุกรในประเทศไทยจะมีรูปแบบการผลิตที่ชัดเจน คือ เริ่มต้นจากฟ่อเม่พันธุ์ และมาถึงลูกสุกรตามสายพันธุ์ ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าลูกสุกรแรกคลอด (piglet) ต้องได้รับการดูแลจากแม่ (nursery pig) เพื่อได้รับนมน้ำเหลืองและภูมิต้านทานอย่างเต็มที่ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังคลอด จึงทำให้ลูกสุกรเจริญเติบโตได้ดี และเพิ่มโอกาสให้มีชีวิตลดลงในช่วงหย่านม (survival rate) (Pigprogress, 2018) หลังจากนั้น เมื่อสุกรเข้าสู่ช่วงหย่านม (weaning pig) จะมีการเปลี่ยนแปลงขั้นวิกฤต (critical period) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงหลายๆด้าน เช่นการเปลี่ยนแปลงสถานที่ จากเล้าคลอดไปสู่คอกสุกรหย่านม หรืออาหารที่ได้รับ ก่อนหน้าได้รับอาหารเหลวเป็นน้ำนม อาหารเลียร่าง (creep feed) และเปลี่ยนมาเป็นอาหารผงหรือเม็ด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงข้างต้นเนี่ยวนำให้ลูกสุกรเกิดความเครียด ส่งผลโดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันของสุกร ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารแบบโฉบฉวย โดยเฉพาะเชื้อ อ.โคไล (*Escherichia coli*) หรือ *E. coli* สายพันธุ์ Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ที่สามารถสร้างสารพิษประเภทเทโรทอกซิน (enterotoxin) ทำให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ถูกทำลาย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของลำไส้ลดลง การใช้ประโยชน์ได้จำกสารอาหารลดลง และแสดงอาการท้องเสีย (Campbell และคณะ 2013) จึงเป็นอีกทางออกหนึ่งที่อุตสาหกรรมจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เช่น โคลิสติน (colistin) ในการป้องกันการติดเชื้อในทางเดินอาหารจาก *E. coli* ในช่วงอาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea: PWD) (Rhouma และคณะ 2017) ซึ่งการใช้ยาอย่างต่อเนื่อง ส่งผลถึงเรื่องการตรวจพบยีนต์อยา colistin (mobile colistin resistance genes, mcr) ในสุกรและสามารถถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้ (Lin และคณะ 2016) ทำให้เกิดการควบคุมการใช้ในสัตว์อย่างไร้กำหนด การหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะสามารถทำได้โดยการใช้สารอาหารเสริมทางเลือก (alternative treatment) ซึ่งปัจจุบันมีมากนัยหลายประเภทที่สามารถทดแทนยาปฏิชีวนะได้อย่างดี ซึ่งสามารถติดตามผลได้จากการเจริญเติบโตของสุกรช่วงหย่านม อัตราการรอดชีวิต ปริมาณอาหารที่กินได้ และการสำรวจและวิเคราะห์อาการท้องเสีย

ในการศึกษานี้จึงได้เลือกสารเสริมทดแทนนิดอื่นที่มีการอ้างอิงว่าสามารถควบคุม และรักษาอาการท้องเสียเนื่องจากการติดเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรได้ มาใช้ผสมอาหารสำหรับลูกสุกรเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในเชิงของการลดอัตราท้องเสีย จำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูล สมรรถนะการเจริญเติบโต เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต (ADG) และลดอัตราแลกเนื้อ (FCR) โดยสารเสริมทดแทนในการศึกษามี ดังนี้ 1. apramycin sulfate ร่วมกับ flavomycin (antimicrobial drug) 2. bromelain (plant extracts) 3. CuSO₄ complex (mineral supplement) 4. butyric acid (acidifier) ร่วมกับ yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) และ 5. Direct Fed Microbial-*Bacillus subtilis* (probiotics)

การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับแนวโน้มของกรมปศุสัตว์ที่ให้มีการควบคุมการใช้ยาโคลิสตินในฟาร์ม โดยมีหนังสือลงวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2560 ขอให้สัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มทั่วประเทศ ตระหนักและให้ใช้ยาดังกล่าวอย่างสมเหตุสมผลตามหลักวิชาการสัตวแพทย์ ไม่ให้ใช้ในการป้องกันและจะให้ใช้ยาโคลิสตินได้ก็ต่อเมื่อไม่มียาปฏิชีวนะได้ใช้ได้แล้วผล ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้มีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น เพื่อยังคงให้ยาโคลิสตินเป็นยาที่ใช้ในการรักษามนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นไปตามแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดูแลด้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 ในยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาด้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง ตามยุทธศาสตร์ที่ 4.1 ลดการใช้ยาด้านจุลชีพในการ

ทำปศุสัตว์และประมงด้วย ดังนั้นการที่มีทางเลือกอื่นที่ทดแทนยาปฏิชีวนะโคลิสตินผสมในอาหารสัตว์จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร ผู้ประกอบการฟาร์มและประชาชนผู้บริโภคที่นำไปที่จะปลอดภัยต่อเชื้อดื/oยาและมียาที่ใช้รักษาเมื่อเจ็บป่วย

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

สถานที่ปฏิบัติงานเจริญผลฟาร์ม ตำบลพิกุลทอง เทศบาลเมืองราชบุรี จังหวัดราชบุรี ลูกสุกรหย่านม พันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ ((ลาร์จไวท์ x แลนเรซ) x ดูroc) จำนวนรวมทั้งหมด 222 ตัว อายุ 24 วัน และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.19 ± 0.63 kg สัตว์จะถูกจำแนกออกเป็น 6 กลุ่มทดลอง ($n=37$) ตามสูตรอาหารทดลอง แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ในคอกที่มีขนาด 8×6 เมตร² ตามเกณฑ์กำหนดมาตรฐานฟาร์ม (สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย, 2019) และเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด (evaporative cooling system) มีน้ำและอาหารเติมให้กินเต็มที่ โดยมีระยะเวลาทำการทดลองทั้งสิ้น 14 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วทางฟาร์มจะนำสุกรไปเลี้ยงเป็นสุกรชนต่อไป อาหารงานวิจัย (experimental diet) เป็นอาหารพื้นฐาน (basal diet) ประกอบไปด้วยโภชนาตามความต้องการของสุกรตามมาตรฐาน NRC (2012) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยอาหารงานวิจัยแต่ละกลุ่มมีรายละเอียดดังนี้

- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 1. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย colistin 160 ppm
- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 2. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย bromelain 12.5 mg/tonne
- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 3. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย apramycin 1 kg/tonne และ flavomycin 125 mg/tonne
- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 4. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย CuSO₄ 3kg/tonne
- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 5. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย butyric acid 1 kg/tonne และ yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 1 kg/tonne
- อาหารงานวิจัยกลุ่มที่ 6. อาหารพื้นฐาน เสริมด้วย probiotic (*Bacillus subtilis*) 1.2 kg/tonne (มีปริมาณ *Bacillus subtilis* 25×10^6 cfu/g)

ตารางที่ 1. รายการวัตถุดิบ และค่าโภชนาอาหารพื้นฐานในงานวิจัย (% วัตถุแห้ง)

รายการวัตถุดิบ	จำนวน (%)
ปลายข้าว	57.5
รำน้ำมันสกัด	1.6
ถั่วอ่อน (Biopro480)	10
กาภถั่วเหลือง	7
ถั่วอ่อนไขมันเต็ม	10
Peptide pro	4
L-lysine	0.3
DL-methionine	0.1

รายการวัตถุดิบ	จำนวน (%)
L-Threonine	0.2
Prelac (milk replacer)	5
Monocalcium phosphate	2.5
Calcium carbonate	1.4
เกลือ	0.1
หัวอาหาร**	0.3
ปริมาตรรวม	100
โภชนาอาหารพื้นฐาน	
วัตถุแห้ง, %	86.2
โปรตีน, %	24
Soluble Protein (% โปรตีน)	16
แป้ง, %	50.3
ไขมัน, %	5.8
NDF, %	8.1
ADF, %	4.4
Digestible energy, DE (Mcal/kg)	4.01
Metabolizable energy, ME (mcal/kg)	3.6

**Supplied 2.40 IU of vitamin A, 0.48 IU of vitamin D, 4000 IU of vitamin E, 0.72 g of vitamin K, 0.069 g of vitamin B1, 1.04 g of vitamin B2, 0.12 g of vitamin B6, 0.006 g of vitamin B12, 7.20 g of nicotinic acid, 2.72 g of pantothenic acid, 34.875 g of Cu as copper sulfate, 19.995 g of Fe as ferrous sulfate, 0.228 g of I as calcium iodate, 13.64 g of Mn as manganese sulfate, 24 g of Zn as zinc sulfate and 0.02 g of Se as sodium selenite.

การบันทึกข้อมูล การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ผล

ลูกสุกร และ อาหาร จะถูกซึ่งน้ำหนัก ในวันที่ 0 และ 14 ของงานทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ อัตราการกินได้ อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการแลกเปลี่ยน และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

อาหารพื้นฐานจะถูกสุ่มเก็บ เพื่อวิเคราะห์ภาพลักษณ์และองค์ประกอบทางโภชนา ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 2016) และ Near infrared spectroscopy (NIR)

มุลคุกสุกรจะถูกเก็บในวันที่ 0 และ 14 ของงานทดลอง โดยจะสุ่มลุกสุกรอย่างน้อย 5 ตัวเพื่อสุ่ม เก็บมุล เพื่อนำไปวิเคราะห์ จำนวนเชื้อ *E. coli* โดย BSC (Betagro Science Center, Bangkok, Thailand) ด้วยวิธี 991.14 และ ISO 6579:2002/Amendment 1:2007 (AOAC, 2016) ข้อมูลที่ได้จะถูกแปลง ด้วย Log argarlithm ฐาน 10

การประเมินร้อยละของอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยทำการบันทึกผลในวันที่ 0 7 และ 14 ของงาน ทดลอง โดยมีสัตวแพทย์ 1 คน เป็นผู้ประเมินตลอดการทดลอง และคำนวณจากสูตร

Diarrhoea percentage = (No. of pigs in each treatment group has a clinical sign of diarrhoea in the same day* 100) / Total number of pigs in treatment group (Kyriakis และคณะ 2003)

คำนวณหา sample size สำหรับการวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA ตามแผนการทดลอง CRD โดยใช้โปรแกรม Minitap 16® (Minitap, 2013)

ข้อมูลจะถูกนำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ย+- ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี One-way analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองตามวิธีของ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ด้วย paired samples T test ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระหว่างวันที่ 0 และ 14 ด้วยโปรแกรม SAS® 9.0 (SAS, 2004)

ผลการทดลอง

จากการทดลองใช้เวลาในการเลี้ยงลูกสุกรอย่างต่อเนื่อง 14 วัน พบร่วมกันไม่มีลูกสุกรเสียชีวิตระหว่างงานทดลอง

ผลการทดลองด้านสมรรถนะการเจริญเติบโต ตั้งแสดงในตารางที่ 2 อาหารกลุ่ม T4 และ T6 มีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในด้านน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 14) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($p<0.01$) ค่า ADG ในกลุ่ม T6 ที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($p<0.01$) และค่า ADG ในกลุ่ม T4 และ T5 มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม T1 เช่นกัน แต่ไม่พบค่าความแตกต่างทางสถิติในด้าน FCR ของลูกสุกรในงานทดลอง ($p>0.05$)

ตารางที่ 2 ผลการทดลองด้านสมรรถนะการเจริญเติบโตของลูกสุกรอย่างต่อเนื่อง

จำนวนสุกร (ตัว)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P-value
วันที่ 1	37	37	37	37	37	37	
วันที่ 14	37	37	37	37	37	37	
น้ำหนักสุกร (kg) วันที่ 1	5.53 ± 0.99	5.86 ± 0.94	6.45 ± 0.99	6.91 ± 1.23	6.30 ± 1.27	6.62 ± 1.43	
น้ำหนักสุกร (kg) วันที่ 14	7.38 ± 1.31 D	7.99 ± 1.08 C	8.84 ± 1.16 B	9.59 ± 1.17 A	8.91 ± 1.23 B	9.61 ± 1.46 A	<0.0001
น้ำหนักเพิ่ม (kg)	1.85 ± 1.23 C	2.13 ± 0.36 BC	2.39 ± 1.03 ABC	2.67 ± 1.66 AB	2.62 ± 1.95 AB	2.99 ± 1.67 A	0.01
ปริมาณการกินได้ รวม (kg/pig)	4.12	3.71	3.79	4.07	4.20	4.15	
%การสูญเสีย	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
ADG (grams/pig/day)	130 ± 9 C	150 ± 3 BC	170 ± 7 ABC	190 ± 12 AB	190 ± 14 AB	210 ± 12 A	0.01
FCR	2.24 ± 1.31	1.78 ± 0.21	1.72 ± 0.39	1.70 ± 1.81	1.68 ± 4.62	1.72 ± 0.59	0.89

A, B, C อักษรที่แตกต่างกันของแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองด้านจำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูล ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าที่เริ่มต้นงานทดลอง (วันที่ 0) จำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูลของแต่ละกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีอัตราสูงสุดในกลุ่มที่ 14 พบว่ากลุ่ม T1 T2 และ T6 มีค่าความแตกต่างทางสถิติด้านเชื้อ *E. coli* ในมูลที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($p<0.01$) ทำนองเดียวกันกับกลุ่ม T4 และ T5 ที่มีแนวโน้มของค่าเชื้อ *E. coli* ในมูลที่น้อยลงใกล้เคียงกับ 3 กลุ่มข้างต้น ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปจากจุดเริ่มต้น และสิ้นสุดงานทดลองนั้นส่งผลต่อเชื้อ *E. coli* ในมูลที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ตารางที่ 3. แสดงจำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูลของลูกสุกรheyarn (หน่วยเป็น Logฐาน 10)

<i>E.coli</i> (cfu/grams), Log10unit	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P-value
วันที่ 1	8.03 ± 0.55	8.34 ± 0.61	8.18 ± 0.48	8.18 ± 0.44	7.52 ± 0.78	8.17 ± 0.80	0.51
วันที่ 14	4.76 ± 0.60 C	5.01 ± 0.51 C	6.39 ± 1.06 A	6.04 ± 0.21 AB	5.26 ± 0.74 BC	5.03 ± 0.42 C	0.002
Paired T-test	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

A, B, C อักษรที่แตกต่างกันของแต่ละกลุ่มนั้นแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองด้านการประเมินร้อยละของสุกรที่แสดงอาการห้องเสียในช่วงหลังheyarn ดังแสดงในตารางที่ 4 ที่เริ่มต้นงานทดลอง (วันที่ 0) ลูกสุกรกว่า 80 เปอร์เซ็นต์จากทุกกลุ่มทดลองแสดงอาการห้องเสียหลังจากนั้นเมื่อพิจารณาที่วันที่ 7 จะพบว่าร้อยละของอัตราห้องเสียในลูกสุกรนั้นลดลงทุกกลุ่มทดลอง ทั้งนี้ พบว่ากลุ่ม T2 และ T6 มีค่าร้อยละของอัตราห้องเสียที่ลดลงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางกลับกัน กลุ่มทดลอง T1 มีค่าร้อยละของอัตราห้องเสียที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดงานทดลอง (วันที่ 14) พบว่าร้อยละของอัตราห้องเสียในลูกสุกรลดลงในทุกกลุ่ม แต่มีเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพบว่าไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4. ร้อยละของการเกิดอาการห้องเสียในลูกสุกรheyarn

ร้อยละอาการห้องเสีย	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P-value
วันที่ 1	83.80 ± 9.63	92.00 ± 6.96	85.20 ± 5.54	88.00 ± 7.65	79.60 ± 4.16	83.20 ± 5.67	0.12
วันที่ 7	50.80 ± 7.40 A	38.80 ± 7.19 B	46.20 ± 5.67 AB	41.60 ± 6.88 AB	44.60 ± 6.84 AB	37.00 ± 5.43 B	0.03
วันที่ 14	4.00 ± 2.24	2.80 ± 1.10	1.80 ± 0.84	2.20 ± 1.30	2.00 ± 1.22	2.00 ± 1.41	0.17

A, B อักษรที่แตกต่างกันของแต่ละกลุ่มนั้นแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

วิจารณ์ผลงานทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเลือกประชากรสุกรในพื้นที่ที่มีการทำปศุสัตว์อย่างหนาแน่น เพื่อให้สภาพแวดล้อม และปัจจัยควบคุมต่างๆ เป็นไปตามธรรมชาติ โดยไม่มีการกำหนดปัจจัยอื่นใดทั้งสิ้น ซึ่งพื้นที่ที่ทำงานวิจัยคือจังหวัดราชบุรี ที่ซึ่งมีการเลี้ยงสุกรมากที่สุดในประเทศไทย (กรมปศุสัตว์, 2560) ซึ่งการเลี้ยงในพื้นที่ปศุสัตว์อย่างหนาแน่นอาจทำให้มีการติดต่อ และระบาดของโรคอย่างซุกซุม อย่างไรก็ตามระบบการเข้าถึงฟาร์ม (access to farm) ของพื้นที่ทำงานวิจัยได้มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) เข้ามาป้องกันปัจจัยแทรกซ้อนจากเชื้อโรคภายนอกได้

สารเสริมทดแทนในงานวิจัยสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. กลุ่ม colistin จัดอยู่ใน polymyxin antibiotics ที่ใช้รักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในสุกร ซึ่งยาปฏิชีวนะชนิดนี้ออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น อี.โคไล ชัลโอมเนลลา และวิบริโอ เป็นต้น ออกฤทธิ์โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (lipid A) ของเชื้อแบคทีเรียให้เสียสภาพ เกิดการร้าวไหลของสารในเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย ในท้องตลาดมีการผลิตโคลิสตินสำหรับผสมอาหารหังที่มีลักษณะเป็นของแข็ง และของเหลว เรียกว่า solid and liquid medicated premixed นอกจากนี้ยังมีโคลิสตินรูปแบบอาหารสัตว์สำเร็จรูปสมโคลิสติน หรือ medicated feed ซึ่งการใช้ยาผสมอาหารเป็นรูปแบบที่เกษตรกรนิยมใช้เพื่อควบคุมการติดเชื้อ และรักษาโรคเนื่องจากการติดเชื้อ อี.โคไลในสุกรระยะตั้งแต่แรกเกิดถึงสุกรที่มีน้ำหนักตัว 25 กิโลกรัม

2. กลุ่มสารสกัดจากพืช โดยสกัด bromelain ได้จากแกนสับปะรด เป็นเอนไซม์กลุ่ม proteases ส่วนประกอบหลักได้แก่ stem bromelain 80% fruit bromelain 10% และ ananain 5% นอกจากนั้น 5% คือ non-protease ได้แก่ phosphatases, glucosidases, peroxidases, cellulases และ glycoproteins (Mondal และคณะ 2011) และพบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่นกัน (Maurer, 2001) ซึ่งจากการรายงานของ Van Beckhoven และคณะ 1995 ระบุว่า bromelain ทำหน้าที่เพ่นเตียวกับเอนไซม์ subtilisins ที่พบได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ทำหน้าที่หลักคือเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในทางเดินอาหาร

3. กลุ่ม antimicrobial drug ยกตัวอย่างเช่น ampicillin gentamicin neomycin fosfomycin tetracycline และ apramycin ซึ่งจากการรายงานของ Quesada และคณะ 2014 พบว่า apramycin มีค่า colistin-susceptible isolates อยู่ที่ 4.5% และค่า colistin-resistant isolates อยู่ที่ 12.40% ซึ่งค่า resistance ที่เกิดขึ้นน้อยกว่าสารกลุ่ม antimicrobial drug อื่นๆได้แก่ tetracycline (93.8%), ampicillin (79.5%), florfenicol (64.3%), cefotaxime (13.2%), neomycin (56.6%), gentamicin (29.1%), ciprofloxacin (28.3%), fosfomycin (7.8%) และ amikacin (0.4%) (Huang และคณะ 2017)

นอกจากนี้ได้มีการเสริมด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม flavomycin ที่เป็นสารเชิงซ้อนของยาปฏิชีวนะ เกิดจากการจำแนก *Streptomyces bambusiensis* และ *Streptomyces ghanaensis* ทำหน้าที่ลดการติดเชื้อของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed utilization) ของสุกรได้ (Huvepharma, 2019)

4. กลุ่มสารแร่ธาตุ copper (Cu) เป็นสารมีประโยชน์ และเป็นเอนไซม์สำคัญกลุ่ม metalloenzymes ในกระบวนการ cytochrome oxidase และ lysyl oxidase ซึ่งจะช่วยลดและป้องกันผลเสียที่เกิดจาก

ความเครียดได้ (Hill, 2013) และปริมาณในการเสริมให้กับลูกสุกรมีระดับที่แนะนำตาม NRC (2012) อยู่ที่ 5-6 mg/kg ของ Cu ที่ใช้ในกระบวนการการสันดาป

5.กลุ่มสาร acidifier คือ butyric acid หรือ butanoic acid เป็นกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) เกิดจากกระบวนการหมักในทางเดินอาหารของสุกร โดยพบว่ามาจาก butyric acid แล้วยังมี propionic acid มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการด้านจุลทรรศน์ในทางเดินอาหาร (Stecher และ Hardt, 2011) แต่ด้วยความที่มีคุณสมบัติเป็นกรด มีฤทธิ์ในการกัดกร่อน และเป็นสารระเหยง่าย ดังนั้น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จึงมีการนำ butyric acid จับกับแร่ธาตุ เช่น Ca และ Na (Machinsky และคณะ 2015)

กลุ่ม yeast คือ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ธรรมชาติช่วยส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ การเติมเยสต์ในอาหารลูกสุกรสามารถช่วยปรับปรุง การย่อยได้ของโปรตีน และเยื่อไผ่ประเภทเยมิเซลโลโลส (Mathew และคณะ 1998) และมีหน้าที่หลักในการเพิ่มภูมิคุ้มกันประเภท IgA (secretory immunoglobulin A) ที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Ren และคณะ 2016) ซึ่งส่งผลโดยตรงในการลดปัญหาท้องเสียในช่วงหย่านม (Shen และคณะ 2009; Trckova และคณะ 2014).

6. กลุ่ม probiotics คือ *Bacillus subtilis* คือจุลินทรีย์เป็นประโยชน์ จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่ปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้จะทำหน้าที่ช่วยให้การย่อยอาหารของสัตว์มีประสิทธิภาพดีขึ้น และพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ให้ดีขึ้น และคุณสมบัติอื่นๆ ที่ส่งผลดีต่อสมรรถภาพสัตว์ การสร้างความแข็งแรงให้กับเซลล์ดูดซึมในลำไส้ ลดอาการท้องเสีย ช่วยเพิ่มการย่อยได้ของโภชนา และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Hu และคณะ 2014; Lee และคณะ 2014; Owusu-Asiedu และคณะ 2014; Prieto และคณะ 2014)

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น กลุ่มสารเสริมทดสอบยาปฏิชีวนะคลิสติน ต่างมีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหาร และลดอัตราการเกิดท้องเสีย ทำให้ส่งผลดีต่อการเพิ่มสมรรถนะการผลิต ทั้งในด้านการเจริญเติบโต ที่อ้างถึง ปริมาณอาหารที่กินได้ ประสิทธิภาพการย่อยได้ของสารอาหาร การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนา ซึ่งจากการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม T1 นั้นมีค่าการเจริญที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มสารเสริมทดสอบ ที่ผู้วิจัยสามารถสรุป 3 หลักการที่จะอธิบายผลข้างต้นได้ดังนี้

1. คุณสมบัติของสารเสริมทดสอบแต่ละกลุ่มมีกลไกการออกฤทธิ์ (mode of action) ที่ซับซ้อนกว่าโคลิสติน เช่น bromelain ที่จัดเป็นเอนไซม์ protease ในทางเดินอาหาร ที่มีคุณสมบัติเข้มเดียว กับ subtilisins ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งยังมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ในช่วงค่า pH ได้ตั้งแต่ 5.0 ถึง 10.0 (Engwerda และคณะ 2001) ซึ่งอธิบายตามหลักกายวิภาคได้คือสามารถทำหน้าที่ได้ตลอดช่วงทางเดินอาหารในส่วนลำไส้เล็ก นอกจากนี้มีผลต่อ secretory signaling pathways ส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ glycoprotein receptors ที่ intestinal mucosa มีคุณสมบัติเป็น anti-adhesion ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ K88+ ETEC (Chandler และ Mynott, 1998)

2. การใช้สารเสริมทดสอบแบบบีจจี้เดียว เช่น Cu ในรูป CuSO₄ อาจมีคุณสมบัติต่อการยับยั้ง อาการท้องเสียหลังหย่านม ที่แคบ โดย Cu ในกระบวนการสันดาปสามารถปรับสภาพทางเดินอาหารส่วนต้นและส่วนกลางให้มีความเป็นกรด ซึ่งหมายความต่อจุลินทรีย์มีประโยชน์ ซึ่งข้อจำกัดคือการลดจำนวนของ lactic acid bacteria, lactobacilli และ streptococci ที่ส่วนท้ายของทางเดินอาหาร (ileal and colonic

microbiota) โดยพบว่าการเสริม Cu จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง cecal VFA (volatile fatty acid) โดยทำให้ A:P ratio (acetic:propionic ratio) เปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังเน้นการแสดงออกของ MDA (malondialdehyde) ที่เป็น lipid peroxidation ของทางเดินอาหารในกรณีที่มีการเสริมทุกสุกรหย่านmAyu 0-14 วัน (Hojberg และคณะ 2005)

3. คุณสมบัติของสารเสริมทดสอบบางกลุ่มต้องการปัจจัยร่วม โดยพบรายงานของ Rekiel และคณะ 2007 กล่าวว่าการเสริม flavomycin ที่ระดับ 100 mg ในอาหาร 1 kg เทียบกับ probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*, yeasts) ในสูตรขุนตั้งแต่ 26 kg ขึ้นไปจนถึง 100 kg พบร่วมกับการเสริม flavomycin ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันกับ probiotic ในด้าน การเจริญเติบโต คุณภาพซาก โลหิตวิทยา และสัมชัญวิทยา สำหรับน้ำใจแสดงให้เห็นว่าการเสริม flavomycin ที่มีการสกัดและจำแนกมาจาก *Streptomyces bambusicola* และ *Streptomyces ghanaensis* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตได้ และส่งผลเชิงบวกต่อคุณภาพซากทั้งปรับปรุงการทำงานของระบบย่อยอาหาร ก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานการใช้ flavomycin ในลูกสุกรอย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ได้จากการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ apramycin ร่วมกับ flavomycin (ปัจจัยร่วม) ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากสารเสริมทดสอบกลุ่มนี้

Ma และคณะ 2015 รายงานคุณสมบัติเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาของ Cu น้ำสามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสูกรได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Perez และคณะ 2011 ที่พบว่าการเสริม Cu ที่ระดับ 100-250 mg/kg ของอาหาร จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กินได้ และลดอัตราสูญเสียของสูกรได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มพื้นที่สันฐานวิทยาของลำไส้ และสุขภาพของลำไส้ให้ดีขึ้นได้ในสุกรทุกวัย (Zhao และคณะ 2007) อาย่าเรเก็ตตา ฟอร์ม (form) ของการเสริม Cu มีหลากหลายรูปแบบ เช่น sulfate (CuSO_4) หรือ tribasis copper chloride (TBCC) ซึ่งประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของ Cu น้ำไม่แตกต่างกัน (Cromwell และคณะ 1998) แต่ CuSO_4 จะสามารถละลายได้ตั้งที่ในน้ำและในสภาพกรด

การเสริม butyric acid มีผลโดยตรงต่อการพัฒนาระบบททางเดินอาหาร เช่น cell proliferation เพิ่มพื้นที่การดูดซึมอาหาร และเป็นบาเรียป้องกันการเข้าทำลายผนังลำไส้จาก *E. coli* (Lu และคณะ 2008; Hanczakowska และคณะ 2014; Huang และคณะ 2015) รวมไปถึงการเพิ่ม gene expression ของยีนสร้างกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมันที่เพิ่มมากขึ้น เช่นกัน โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) (Le Gall และคณะ 2009; Lu และคณะ 2012) และ yeast ที่มีคุณสมบัติชัดเจนในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับ probiotics และยังมีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ การใช้ออกซิเจนในการเมทานโบลิซึม เพราะทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม anaerobic bacteria มีประสิทธิภาพการทำงานดีขึ้น โดยหน้าที่หลักของ anaerobic bacteria คือการลดการผลิต CH₄ และเพิ่มการผลิต lactic acid โดยเริ่มจากการที่ pH ในทางเดินอาหารมีความหมายสูงต่อการเมทานโบลิซึม VFA ส่งผลทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม proteolytic bacteria เพิ่มขึ้น (Ogbuewu และคณะ 2018) และการทำงานร่วมกันของ butyric acid และ yeast (ปัจจัยร่วม) ส่งผลโดยรวมครบถ้วนด้าน โดยกรดจะสนับสนุนด้านการดูดซึมอาหาร เพิ่มการใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหาร และ yeast จะเพิ่มจุลินทรีย์มีประโยชน์ต่อระบบ และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้จากเอนไซม์

กลุ่มสุดท้ายคือ probiotics (*Bacillus subtilis*) กลไกการทำงานของ probiotics ต่ออาการท้องเสียหลังหย่านม โดย *Bacillus subtilis* เมื่อเดินทางเข้าสู่ทางเดินอาหารส่วนลำไส้เล็ก จะมีการเข้าเกาะกับผนัง

ลำไส้ และมีการผลิต organic acid, hydrogen peroxide, lactoferrin และ bacteriocin ซึ่งจัดเป็น antimicrobial substances ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค และด้วยเอนไซม์ที่สำคัญจาก probiotics เช่น *b-galactosidase*, superoxide dismutase (SOD) และกลุ่ม proteolytic enzyme ทำให้กิจกรรมของทางเดินอาหาร มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น (Stecchini และคณะ 2001) และพัฒนาระบบ gut associated lymphoid tissue (GALT) ส่งผลพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน ยิ่งไปกว่านั้น *Bacillus subtilis* แสดงผลโดยเด่นในด้านสมรรถนะ การผลิตต่อห้องเสียหลังหย่านม

บทสรุป

การใช้สารเสริมทดแทนยาปฏิชีวนะโคลิสตินต่ออาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea: PWD) ที่มีคุณสมบัติการป้องกัน รักษาอาการท้องเสีย ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและพัฒนาระบบทางเดินอาหาร จากผลการทดลองพบว่าอาหารทดลองห้อง 5 กลุ่ม (T2-T6) มีคุณสมบัติสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ (ABO replacer) โดยสารเสริมกลุ่ม (T2) bromelain และกลุ่ม (T3) apramycin ร่วมกับ flavomycin ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับ (T1) โคลิสติน อาหารกลุ่ม metabolic intermediate คือ (T4) CuSO₄ และกลุ่ม (T5) butyric acid ร่วมกับ yeast ให้ผลการทดลองด้านประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีกว่า 3 กลุ่มข้างต้น และกลุ่ม (T6) probiotics นอกจากให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่ม (T1) โคลิสติน แล้วยังให้ผลการทดลองด้านสมรรถนะการผลิตที่โดยเด่นกว่าทุกกลุ่ม งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารเสริม ต้องให้ผลเป็นวงกว้างต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้คุณสมบัติของสารเสริมต่ออาการท้องเสียหลังหย่านม ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการใช้ปัจจัยร่วม หรือปัจจัยกลุ่ม (2 กลุ่ม ขึ้นไป) เพื่อศึกษาอิทธิพลร่วมของสารเสริม (interaction effect)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในการทำงานวิจัย และสัตวแพทย์หญิงวนิดา แจ้งประจักษ์, สัตวแพทย์หญิงวชิราพร แสนสม, สัตวแพทย์หญิงน้ำรินา ชินรัตน์ลาภ ที่ช่วยประสานงาน เรียบเรียงข้อมูล ออกแบบที่ร่วมงาน และเจ้าหน้าที่กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์, 2560. จาก <http://ict.dld.go.th/th2/index.php/th/report/529-report-thailand-livestock/reportservey2560/1243-2560-prov>.

สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย. 2560. เกณฑ์กำหนดมาตรฐานฟาร์ม. จาก <https://tsva.or.th/standard-of-pig-farm-criteria>.

AOAC, Methods of Analysis of AOAC International. 2016. 20th Method 991.14.

Campbell JM, Crenshaw JD and Javier P 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biot.* 4(1):19.

Chandler DS and Mynott TL 1998. Bromelain protects piglets from diarrhea caused By oral challenge with K88 positive Enterotoxigenic Escherichiacoli. *Gut.* 43:196–202.

Cromwell GL, Lindemann MD, Monegue HJ, Hall DD and Orr Jr DE 1998. Tribasic copper chloride and copper sulfate as copper sources for weanling pigs. *J Anim Sci.* 76:118-123.

Engwerda C, Randew D, Ladhams A and Mynott TL 2001. Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. *Cell Immunol.* 210:66–75.

Hanczakowska E, Niwinska B, Grela ER, Węglarzy K and Okon K 2014. Effect of dietary glutamine, glucose and/or sodium butyrate on piglet growth, intestinal environment, subsequent fattener performance, and meat quality. *Czech J Anim Sci.* 59:460-470.

Hojberg O, Canibe N, Poulsen HD, Hedemann MS and Jensen BB 2005. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl Environ Microbiol* 71:2267-2277.

Hill GM 2013. Minerals and mineral utilization in swine. In: Chiba LI, editor. Sustainable swine nutrition. Oxford, U.K.: Blackwell Publishing Ltd. p.186-189.

Hu Y, Dun Y, Li S, Zhao S, Peng N and Liang Y 2014. Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on growth performance, diarrhea and faecal bacterial flora of weaned piglets. *Asian Australas J Anim Sci.* 27:1131–40.

Huang C, Song P, Fan P, Hou C, Thacker P and Ma X 2015. Dietary sodium butyrate decreases post weaning diarrhea by modulating intestinal permeability and changing the bacterial communities in weaned piglets. *J Nutr.* 145:2774-2780.

- Huang X, Yu L, Chen X, Zhi C, Yao X, Liu Y, Wu S, Guo Z, Yi L and Zeng Z 2017. High prevalence of colistin resistance and mcr-1 gene in *Escherichia coli* isolated from food animals in China. *Front Microbial.* 8: 562.
- Huvepharma. 2019. ຈາກ <https://www.huvepharma.com/products/flavomycinr-40>
- Kyriakis SCI, Georgoulakis A, Spais C, Alexopoulos CC and Kritas SK 2003. Evaluation of toyocerin, a probiotic containing *Bacillus* *toyoi* spores, on health status and productivity of weaned, growing and finishing pigs. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 16(9):1326-1331
- Lee SH, Ingalev SL, Kim JS, Kim KH, Lokhande A and Kwon IK 2014. Effects of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 grown on citrus-juice waste and corn-soybean meal substrate on performance and gut health of weaning pigs. *Anim Nutr Feed Technol.* 14:225.
- Lu R, Wang X, Sun DF, Tian XQ, Zhao SL and Chen YX 2008. Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer. *Epigenetics.* 3:330-335..
- Le Gall M, Gallois M, Seve B, Louveau I, Holst JJ and Oswald IP 2009. Comparative effect of orally administered sodium butyrate before or after weaning on growth and several indices of gastrointestinal biology of piglets. *Br J Nutr.* 102:1285-1296.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R and Spencer J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet infect Dis.* 16:161–168.
- Lu H, Su S and Ajuwon KM 2012. Butyrate supplementation to gestating sows and piglets induces muscle and adipose tissue oxidative genes and improves growth performance. *J Anim Sci.* 90(4):430-432.
- Ma YL, Zanton GI, Zhao J, Wedekind K, Escobar J and Vazquez-Anon M 2015. Multitrial analysis of the effects of copper level and source on performance in nursery pigs. *J Anim Sci.* 93:606-614.
- Machinsky TG, Kessler M, Ribeiro AML, Moraes L, Mello da Silva IC and Mayorga-Cortes ME 2015. Nutrient digestibility and Ca and P balance in pigs receiving butyric acid, phytase and different calcium levels. *Ciencia Rural.* 40:2350-2355.
- Mathew AG, Chattin SE, Robbins CM and Golden DA 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J Anim Sci.* 76:2138-2145.

- Maurer HR 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci.* 58:1234–1245.
- Minitab (Version 16) [Software] 2013. [Last accessed on 2013 Aug 28]. Available from: <http://www.minitab.com/en-US/products/minitab/default.aspx>
- Mondal S, Bhattacharya S, Pandey JN and Biswas M 2011. Evaluation of acute anti-inflammatory effect of *Ananas comosus* leaf extract in Rats. *Pharmacology Online* 3: 1312–1315.
- NRC. In: Nutrient requirements of swine. 11th rev. Washington, DC: Natl. Acad. Press; 2012.
- Ogbuewu IP, Okoro VM, Mbajiorgu EF and Mbajiorgu CA 2018. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and its effect on production indices of livestock and poultry — a review. *Comp Clin Pathol.* 28:669–677
- Owusu-Asiedu A, Jaworski NW, Awati AA and Stein HH 2014. Effect of *Bacillus* spp. direct-fed microbial supplementation on the nutrient digestibility by weanling pigs. *J Anim Sci.* 92(2):143.
- Perez VG, Waguespack AM, Bidner TD, Southern LL, Fakler TM and Ward TL 2011. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs after weaning. *J Anim Sci.* 89:414–425.
- Pigprogress, A balanced approach in sow and piglet diets. 2018. [Online] Available: <https://www.pigprogress.net/Nutrition/Articles/2018/9/A-balanced-approach-in-sow-and-piglet-diets-327524E>. Accessed June 1, 2018.
- Prieto ML, Laurie OS, Shiao PT, McLoughlin P, O'Donovan RMC, Kent RM, Cassidy JP, Hughes H, Gardiner GE and Lawlor PG 2014. Evaluation of the efficacy and safety of a marine-derived bacillus strain for use as an in-feed probiotic for newly weaned pigs. *PLoS One* 9(2):88599.
- Quesada A, Porrero MC, Tellez S, Palomo G, Garcia M and Dominguez L 2014. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother.* 70:71–74.
- Rekiel A, Wiecek J, Bielecki W, Gajewska J, Cichowicz M, Kulisiwicz J, Batorska M, Roszkowski T and Beyga K 2007. Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIO-MOS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of intestine and composition of microflora. *Arch Tierz Dummerstorf.* 50:172–180.

- Ren W, Wang K, Yin J, Chen S, Liu G, Tan B, Wu G, Bazer FW, Peng Y and Yin Y 2016. Glutamine-induced secretion of intestinal secretory immunoglobulin A: A mechanistic perspective. *Front Immunol.* 7:503.
- Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry FF and Letellier A 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non colistin based control strategies. *Acta Vet Scand.* 59:31.
- Shen Y B, Piao X S, Kim S W, Wang L, Liu P, Yoon I and Zhen YG 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J Anim Sci.* 87:2614–2624.
- Statistical Analysis System (SAS). 2004. SAS Online. Doc, Version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC: USA
- Stecchini ML Torre MD and Munari M 2001. Determination of peroxy radical scavenging of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 64:183.
- Stecher B and Hardt WD 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol.* 14:82-91.
- Trckova M, Faldyna M, Alexa P, Sramkova Zajacova Z, Gopfert E, Kumprechtova D, Auclair E and D'Inca R 2014. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *J Anim Sci.* 92:767–774.
- Van Beckhoven RF, Zenting HM, Maurer KH, Van Solingen P and Weiss A 1995. Bacillus cellulases and its application for detergents and textile treatment. *EPOff.* 739:982–988.
- Zhao J, Harper AF, Estienne MJ, Webb Jr KE, McElroy AP and Denbow DM 2007. Growth performance and intestinal morphology responses in early weaned pigs to supplementation of antibiotic-free diets with an organic copper complex and spray-dried plasma protein in sanitary and non-sanitary environments. *J Anim Sci.* 85:1302-1310.