

การศึกษาทางเลือกอื่นเพื่อทดแทนการใช้ยาโคลิสตินผสมในอาหารสัตว์ในฟาร์มสุกรเพื่อรักษาอาการท้องเสีย
เนื่องจากการติดเชื้อ อี. โคลิ. (*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 งามภักดิ์¹, สุนิตย์ มีบำรุง², ภาณุมาศ คงปันนา², เดชฤทธิ์ นิลอุบล²

บทคัดย่อ

การใช้ยาโคลิสตินในลูกสุกรหย่านมเพื่อลดปัญหาท้องเสีย รวมไปถึงการสูญเสีย ในช่วง 2 สัปดาห์แรกอาจเป็นสาเหตุให้เกิดเชื้อดื้อยาได้ วัตถุประสงค์งานวิจัยเพื่อศึกษาสารเสริมทดแทนยาโคลิสตินในลูกสุกรหย่านม 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 CuSO_4 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 พบว่า ค่า 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) พบว่าวันที่ 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 พบว่าทุกกลุ่มอาหารทดลองสามารถลดอาการท้องเสียได้จากวันที่ 0 ถึง 14 นอกจากนี้ในวันที่ 7 พบว่า T2 และ T6 มีค่าร้อยละของสุกรที่แสดงอาการท้องเสียที่น้อยที่สุด ($p<0.05$) สรุปงานทดลองอาหารทั้ง 5 กลุ่ม (T2-T6) สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมทดแทนยาโคลิสตินได้ โดยมีคุณสมบัติที่เพิ่มสมรรถภาพการผลิต ทั้งด้านการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ก่ออาการท้องเสีย และอาการท้องเสียที่แสดง

คำสำคัญ: สารเสริมทดแทน ยาปฏิชีวนะ สุกรหย่านม 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 × Large white) × 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 เริ่มต้นจากพ่อแม่พันธุ์ และมาถึงลูกสุกรตามสายพันธุ์ ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าลูกสุกรแรกคลอด (piglet) ต้องได้รับการดูแลจากแม่ (nursery pig) เพื่อได้รับนมแม่เหลืองและภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติที่ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังคลอด จึงทำให้ลูกสุกรเจริญเติบโตได้ดี และเพิ่มโอกาสมีชีวิตรอดในช่วงหย่านม (survival rate) (Pigprogress, 2018) หลังจากนั้น เมื่อสุกรเข้าสู่ช่วงหย่านม (weaning pig) จะมีการเปลี่ยนแปลงขั้นวิกฤต (critical period) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงหลายๆ ด้าน เช่นการเปลี่ยนแปลงสถานที่ จากเล้าคลอดไปสู่คอกสุกรหย่านม หรืออาหารที่ได้รับ ก่อนหน้าได้รับอาหารเหลวเป็นนํ้านม อาหารเลียราง (creep feed) และเปลี่ยนมาเป็นอาหารผงหรือเม็ด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงข้างต้นเหล่านี้นำให้ลูกสุกรเกิดความเครียด ส่งผลโดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันของสุกร ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารแบบเฉียบพลัน โดยเฉพาะเชื้อ อี.โคไล (*Escherichia coli* หรือ *E. coli*) สายพันธุ์ Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ที่สามารถสร้างสารพิษประเภทเอนเทโรทอกซิน (enterotoxin) ทำให้เซลล์เยื่อผนังลำไส้ถูกทำลาย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของลำไส้ลดลง การใช้ประโยชน์ได้จากสารอาหารลดลง และแสดงอาการท้องเสีย (Campbell และคณะ 2013) จึงเป็นอีกทางออกหนึ่งที่อุตสาหกรรมจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เช่น โคลิสติน (colistin) ในการป้องกันการติดเชื้อในทางเดินอาหารจาก *E. coli* ในช่วงอาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea: PWD) (Rhouma และคณะ 2017) ซึ่งการใช้ยาอย่างต่อเนื่อง ส่งผลถึงเรื่องการตรวจพบยีนดื้อยา colistin (mobile colistin resistance genes, mcr) ในสุกรและสามารถถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้ (Liu และคณะ 2016) ทำให้เกิดการควบคุมการใช้ในสัตว์ อย่างไรก็ตาม การหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะสามารถทำได้โดยการใช้สารอาหารเสริมทางเลือก (alternative treatment) ซึ่งปัจจุบันมีมากมายหลายประเภทที่สามารถทดแทนยาปฏิชีวนะได้อย่างดี ซึ่งสามารถติดตามผลได้จากการเจริญเติบโตของสุกรช่วงหย่านม อัตราการรอดชีวิต ปริมาณอาหารที่กินได้ และการสำรวจและวิเคราะห์อาการท้องเสีย

ในการศึกษานี้จึงได้เลือกสารเสริมทดแทนชนิดอื่นที่มีการอ้างอิงว่าสามารถควบคุม 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)

การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับแนวนโยบายของกรมปศุสัตว์ที่ให้มีการควบคุมการใช้ยาโคลิสตินในฟาร์ม โดยมีหนังสือลงวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2560 ขอให้สัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มทั่วประเทศ ตระหนักและให้ใช้ยาดังกล่าวอย่างสมเหตุสมผลตามหลักวิชาการสัตวแพทย์ ไม่ให้ใช้ในการป้องกันและจะให้ใช้ยาโคลิสตินได้ก็ต่อเมื่อไม่มียาปฏิชีวนะใดใช้ได้แล้วผล ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น เพื่อยังคงให้ยาโคลิสตินเป็นยาที่ใช้ในการรักษามนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นไปตามแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 ในยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง ตามยุทธศาสตร์ที่ 4.1 ลดการใช้ยาต้านจุลชีพในการ

ทำปศุสัตว์และประมงด้วย ดังนั้นการที่มีทางเลือกอื่นที่ทดแทนยาปฏิชีวนะโคลิสตินผสมในอาหารสัตว์จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร ผู้ประกอบการฟาร์มและประชาชนผู้บริโภคทั่วไปที่จะปลอดภัยต่อเชื้อดื้อยาและมียาที่ใช้รักษาเมื่อเจ็บป่วย

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

สถานที่ปฏิบัติงานเจริญผลฟาร์ม ตำบลพิบูลทอง เทศบาลเมืองราชบุรี จังหวัดราชบุรี ลูกสุกรหย่านมพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ ((ลาร์จไวท์ x แลนเรซ) x ดุร็อค) จำนวนรวมทั้งหมด 222 ตัว อายุ 24 วัน และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.19 ± 0.63 kg สัตว์จะถูกจำแนกออกเป็น 6 กลุ่มทดลอง (n=37) ตามสูตรอาหารทดลองแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ในคอกที่มีขนาด 8 x 6 เมตร² ตามเกณฑ์กำหนดมาตรฐานฟาร์ม (สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย, 2019) และเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด (evaporative cooling system) มีน้ำและอาหารเติมให้กินเต็มที่ โดยมีระยะเวลาทำการทดลองทั้งสิ้น 14 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วทางฟาร์มจะนำสุกรไปเลี้ยงเป็นสุกรขุนต่อไป อาหารงานวิจัย (experimental diet) เป็นอาหารพื้นฐาน (basal diet) ประกอบไปด้วยโภชนะตามความต้องการของสุกรตามมาตรฐาน 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 และค่าโภชนะอาหารพื้นฐานในงานวิจัย (% วัตถุแห้ง)

รายการวัตถุดิบ	จำนวน (%)
ปลายข้าว	57.5
รำน้ำมันสกัด	1.6
ถั่วอบ (Biopro480)	10
กากถั่วเหลือง	7
ถั่วอบไขมันเต็ม	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
ปริมาณรวม	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, 0.048 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 จะถูกชั่งน้ำหนัก ในวันที่ 0 และ 14 ของงานทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ อัตราการกินได้ อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

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

มูลลูกสุกรจะถูกเก็บในวันที่ 0 และ 14 ของงานทดลอง โดยจะสุ่มลูกสุกรอย่างน้อย 5 ตัวเพื่อสุ่มเก็บมูล 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 argarithm ฐาน 10

การประเมินร้อยละของอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยทำการบันทึกผลในวันที่ 0 7 และ 14 ของงานทดลอง 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

จากงานทดลองใช้เวลาในการเลี้ยงลูกสุกรหย่านมทั้งหมด 14 วัน พบว่าไม่มีลูกสุกรเสียชีวิตระหว่างงานทดลอง

ผลการทดลองด้านสมรรถนะการเจริญเติบโต ดังแสดงในตารางที่ 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 ผลการทดลองด้านสมรรถนะการเจริญเติบโตของลูกสุกรหย่านม

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 อักษรที่ต่างกันของแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองด้านจำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูล ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าที่เริ่มต้นงานทดลอง (วันที่ 0) จำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูลของแต่ละกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เมื่อสิ้นสุดงานทดลอง (วันที่ 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* ในมูลที่ทดลองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ตารางที่ 3. แสดงจำนวนเชื้อ *E. coli* ในมูลของลูกสุกรหย่านม (หน่วยเป็น Log ฐาน 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 อักษรที่แตกต่างกันของแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองด้านการประเมินร้อยละของสุกรที่แสดงอาการท้องเสียในช่วงหลังหย่านม ดังแสดงในตารางที่ 4 ที่เริ่มต้นงานทดลอง (วันที่ 0) ลูกสุกรกว่า 80 เปอร์เซ็นต์จากทุกกลุ่มทดลองแสดงอาการท้องเสีย หลังจากนั้นเมื่อพิจารณาที่วันที่ 7 จะพบว่าร้อยละของอัตราท้องเสียในลูกสุกรนั้นลดลงทุกกลุ่มทดลอง ทั้งนี้พบว่ากลุ่ม T2 และ T6 มีค่าร้อยละของอัตราท้องเสียที่ลดลงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางกลับกัน กลุ่มทดลอง T1 มีค่าร้อยละของอัตราท้องเสียที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดงานทดลอง (วันที่ 14) พบว่าร้อยละของอัตราท้องเสียในลูกสุกรลดลงในทุกกลุ่ม แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพบว่าไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4. ร้อยละของการเกิดอาการท้องเสียในลูกสุกรหย่านม

ร้อยละอาการท้องเสีย	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 อักษรที่แตกต่างกันของแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$)

วิจารณ์ผลงานทดลอง

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

สารเสริมทดแทนในงานวิจัยสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. กลุ่ม colistin จัดอยู่ใน polymyxin antibiotics ที่ใช้รักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในสุกร ซึ่งยาปฏิชีวนะชนิดนี้ออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น อี.โคไล ซัลโมเนลลา และไวรัสโอ เป็นต้น ออกฤทธิ์โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (lipid A) ของเชื้อแบคทีเรียให้เสียสภาพ เกิดการรั่วไหลของสารในเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย ในท้องตลาดมีการผลิตโคลิสตินสำหรับผสมอาหารทั้งที่มีลักษณะเป็นของแข็ง และของเหลว เรียกว่า solid and liquid medicated premixed นอกจากนี้ยังมีโคลิสตินรูปแบบอาหารสัตว์สำเร็จรูปผสมโคลิสติน 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) และพบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นกัน (Maurer, 2001) ซึ่งจากการรายงานของ Van Beckhoven และคณะ 1995 ระบุว่า bromelain ทำหน้าที่เช่นเดียวกับเอนไซม์ subtilisins ที่พบได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus amyloliquifaciens* 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 อื่นๆ ได้แก่ 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 bambergiensis* 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 ที่ใช้ในกระบวนการสันดาป

5. กลุ่มสาร acidifier คือ butyric acid หรือ butanoic acid เป็นกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) เกิดจากกระบวนการหมักในทางเดินอาหารของสุกร โดยพบว่านอกจาก butyric acid แล้วยังมี propionic acid มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการต้านจุลชีพก่อโรคในทางเดินอาหาร (Stecher และ Hardt, 2011) แต่ด้วยความที่มีคุณสมบัติเป็นกรด มีฤทธิ์ในการกักกร่อน และเป็นสารระเหยง่าย ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จึงมีการนำ butyric acid จับกับแร่ธาตุ เช่น Ca และ Na (Machinsky และคณะ 2015)

กลุ่ม yeast คือ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะธรรมชาติช่วยส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ การเติมยีสต์ในอาหารลูกสุกรสามารถช่วยปรับปรุงการย่อยได้ของโปรตีน และเยื่อใยประเภทเฮมิเซลลูโลส (Mathew และคณะ 1998) และมีหน้าที่หลักในการเพิ่มภูมิคุ้มกันประเภท sIgA (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 และคุณสมบัติอื่นๆที่ส่งผลดีต่อสมรรถภาพสัตว์ การสร้างความแข็งแรงให้กับเซลล์ดูดซึมในลำไส้ ลดอาการท้องเสีย ช่วยเพิ่มการย่อยได้ของโภชนา และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Hu และคณะ 2014; Lee และคณะ 2014; Owusu-Asiedu และคณะ 2014; Prieto และคณะ 2014)

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น กลุ่มสารเสริมทดแทนยาปฏิชีวนะโคลิสติน ต่างมีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหาร และลดอัตราการเกิดท้องเสีย ทำให้ส่งผลดีต่อการเพิ่มสมรรถนะการผลิตทั้งในด้านการเจริญเติบโต ที่อ้างอิง ปริมาณอาหารที่กินได้ ประสิทธิภาพการย่อยได้ของสารอาหาร การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนา ซึ่งจากงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม T1 นั้นมีค่าการเจริญที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มสารเสริมทดแทน ทีมผู้วิจัยสามารถสรุป 3 หลักการที่จะอธิบายผลข้างต้นได้ดังนี้

1. คุณสมบัติของสารเสริมทดแทนแต่ละกลุ่มมีกลไกการออกฤทธิ์ (mode of action) ที่ซับซ้อนกว่าโคลิสติน เช่น bromelain ที่จัดเป็นเอนไซม์ protease ในทางเดินอาหาร ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ subtilisin 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. การใช้สารเสริมทดแทนแบบปัจจัยเดี่ยว เช่น Cu ในรูป CuSO_4 อาจมีคุณสมบัติต่อการยับยั้ง อาการท้องเสียหลังหย่านม ที่แคบ โดย Cu ในกระบวนการสันดาปสามารถปรับสภาพทางเดินอาหารส่วนต้นและส่วนกลางให้มีความเป็นกรด ซึ่งเหมาะสมต่อจุลินทรีย์มีประโยชน์ ซึ่งข้อจำกัดคือการลดจำนวนของ lactic acid bacteria, lactobacilli และ streptococci ที่ส่วนท้ายของทางเดินอาหาร (ileal and colonic

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

3. คุณสมบัติของสารเสริมทดแทนบางกลุ่มต้องการปัจจัยร่วม โดยพบการรายงานของ Rekiel และคณะ 2007 กล่าวว่า การเสริม flavomycin ที่ระดับ 100 mg ในอาหาร 1 kg เทียบกับ probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*, yeasts) ในสุกรขุนตั้งแต่ 26 kg ขึ้นไปจนถึง 100 kg พบว่าการเสริม flavomycin ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันกับ probiotic ในด้าน การเจริญเติบโต คุณภาพซาก โลหิตวิทยา และสัญญาณวิทยาลำไส้ นั้นอาจแสดงให้เห็นว่าการเสริม flavomycin ที่มีการสกัดและจำแนกมาจาก *Streptomyces bambergiensis* และ *Streptomyces ghanaensis* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตได้ และส่งผลเชิงบวกต่อคุณภาพซากรวมทั้งปรับปรุงการทำงานของระบบย่อยอาหาร ก่อนหน้านี้ไม่มีการรายงานการใช้ flavomycin ในลูกสุกรหย่านม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ apramycin ร่วมกับ flavomycin (ปัจจัยร่วม) ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากสารเสริมทดแทนกลุ่มอื่นๆ

Ma และคณะ 2015 รายงานคุณสมบัติเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาของ Cu นั้นสามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสุกรได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Perez และคณะ 2011 ที่พบว่า การเสริม Cu ที่ระดับ 100-250 mg/kg ของอาหาร จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กินได้ และลดอัตราสูญเสียของสุกรได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มพื้นที่สัญญาณวิทยาลำไส้ และสุขภาพของลำไส้ให้ดีขึ้นได้ในสุกรหย่านม (Zhao และคณะ 2007) อย่างไรก็ตาม รูปแบบ (form) ของการเสริม Cu มีหลากหลายรูปแบบ เช่น sulfate (CuSO_4) หรือ tribasis copper chloride (TBCC) ซึ่งประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของ Cu นั้นไม่แตกต่างกัน (Cromwell และคณะ 1998) แต่ CuSO_4 จะสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและในสภาพกรด

การเสริม butyric acid มีผลโดยตรงต่อการพัฒนาระบบทางเดินอาหาร เช่น cell proliferation เพิ่มพื้นที่การดูดซึมอาหาร และเป็นบาเรียป้องกันการเข้าทำลายผนังลำไส้จาก *E. coli* (Lu และคณะ 2008; Hanczakowska และคณะ 2014; Huang และคณะ 2015) รวมไปถึงการเพิ่ม gene expression ของ ยีนสร้างกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมันที่เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) (Le Gall และคณะ 2009; Lu และคณะ 2012) และ yeast ที่มีคุณสมบัติชัดเจนในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับ probiotics และยังมีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ การใช้ออกซิเจนในการเมทาโบลิซึม เพราะทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม anaerobic bacteria มีประสิทธิภาพการทำงานดีขึ้น โดยหน้าที่หลักของ anaerobic bacteria คือการลดการผลิต CH_4 และเพิ่มการผลิต lactic acid โดยเริ่มจากการที่ pH ในทางเดินอาหารมีความเหมาะสมต่อการเมทาโบลิซึม VFA ส่งผลทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม proteolytic bacteria เพิ่มขึ้น (Ogbuewu และคณะ 2018) และการทำงานร่วมกันของ butyric acid และ yeast (ปัจจัยร่วม) ส่งผลโดยรวมครบทุกด้าน โดยกรดจะสนับสนุนด้านการดูดซึมอาหาร เพิ่มการใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหาร และ yeast จะเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อระบบ 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* แสดงผลโดดเด่นในด้านสมรรถนะการผลิตต่อท้องเสียหลังหย่านม

บทสรุป

การใช้สารเสริมทดแทนยาปฏิชีวนะโคลิสตินต่ออาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea: PWD) ที่มีคุณสมบัติการป้องกัน รักษาอาการท้องเสีย ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและพัฒนาระบบทางเดินอาหาร จากผลการทดลองพบว่าอาหารทดลองทั้ง 5 กลุ่ม (T2-T6) มีคุณสมบัติสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ (ABO replacer) โดยสารเสริมกลุ่ม (T2) bromelain และกลุ่ม (T3) apramycin ร่วมกับ flavomycin ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับ (T1) โคลิสติน อาหารกลุ่ม metabolic intermediate คือ (T4) CuSO_4 และกลุ่ม (T5) butyric acid ร่วมกับ yeast ให้ผลการทดลองด้านประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีกว่า 3 กลุ่มข้างต้น และกลุ่ม (T6) probiotics นอกจากให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่ม (T1) โคลิสติน แล้วยังให้ผลการทดลองด้านสมรรถนะการผลิตที่โดดเด่นกว่าทุกกลุ่ม งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารเสริมต้องให้ผลเป็นวงกว้างต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้คุณสมบัติของสารเสริมต่ออาการท้องเสียหลังหย่านม ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการใช้ปัจจัยร่วม หรือปัจจัยกลุ่ม (2 กลุ่มขึ้นไป) เพื่อศึกษาอิทธิพลร่วมของสารเสริม (interaction effect)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในการทำงานวิจัย และสัตวแพทย์หญิงวนิดา แจ่มประจักษ์, สัตวแพทย์หญิงวชิราพร แสนสม, สัตวแพทย์หญิงณัฐวีณา ชินรัตน์ลาภ ที่ช่วยประสานงาน เรียบเรียงข้อมูล ออกพื้นที่ร่วมงาน และเจ้าหน้าที่กองควบคุมอาหารและ ยาสัตว์ 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, Randrew 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, Wełglarzy 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.
- Huvephamma. 2019. <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, Shiau 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, Kulisiewicz 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.