ข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement)
และ
หลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยของ
การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

โดย

คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement)

และ

หลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

โดย

คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Probiotic V.04_04/07/2022

สารบัญ

		หน้า
ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป		
1.1	ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อทางการค้าของจุลินทรีย์	1
1.2	แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ และสถานที่เก็บรักษา	1
1.3	คุณภาพหรือมาตรฐานของจุลินทรีย์ (specification)	1
1.4	รายละเอียดผู้ผลิตหรือผู้นำเข้า	1
ส่วนที่ 2 ข้อมูลความปลอดภัยและคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร		
2.	ผลการตรวจเอกลักษณ์ของจุลินทรีย์	2
2.1	ผลการตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ทางลักษณะ (phenotype)	2
2.2	ผลการตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ทางพันธุกรรม (genotype)	2
3.	ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก	6
3.1	การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร	6
3.2	การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี	6
3.3	ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อมูกหรือเซลล์ผิวเยื่อบุของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์	6
3.4	ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี	6
3.5	คุณสมบัติอื่นๆ (ถ้ามี)	6
4.	ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์	7
4.1	การดื้อต่อสารปฏิชีวนะ	7
4.2	การประเมินฤทธิ์ทางแมแทบอลิก	9
4.3	การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์	9
4.4	การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด	9
4.5	การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ	9
4.6	ฤทธิ์ทางฮีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง	10
5.	ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในต่างประเทศ (ถ้ามี)	10

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1.1 ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อทางการค้าของจุลินทรีย์

- ชื่อวิทยาศาสตร์: ระบุชื่อ จีนัส สปีชีส์ และชื่อหรือรหัสสายพันธุ์ (strain name or code) ของจุลินทรีย์ที่ต้องการประเมินให้ชัดเจน ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ระบุควรเป็นชื่อที่เป็นที่ยอมรับและเป็นปัจจุบัน กรณีมีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ใหม่ให้ระบุชื่อเดิมด้วย
- ชื่อทางการค้าของจุลินทรีย์: ระบุชื่อที่ใช้ในการค้า (ถ้ามี)

1.2 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ (source of microorganism) และสถานที่เก็บรักษา

- ระบุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ (source of microorganism) เช่น แยกได้จากผักดอง เป็นต้น
- ระบุแหล่งที่เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ทั้งนี้ ควรเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้ในหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล (internationally recognized culture collection) อย่างน้อย 1 แห่ง ตลอดระยะเวลาการใช้จุลินทรีย์ พร้อมระบุ accession number และคลังที่เก็บ

1.3 คุณภาพหรือมาตรฐานของจุลินทรีย์ (specification)

- ระบุผลการทดสอบ ดังนี้

ข้อกำหนดที่ต้องตรวจวิเคราะห์	ข้อกำหนดตามคุณภาพหรือมาตรฐาน
จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	
- *Staphylococcus aureus*	- ไม่พบต่อ 0.1 กรัม
- *Clostridium* spp.	- ไม่พบต่อ 0.1 กรัม
- *Salmonella* spp.	- ไม่พบต่อ 25 กรัม
อี.โคไล (*Escherichia coli*)	- น้อยกว่า 3 ต่อ 1 กรัม โดยวิธีเอ็มพีเอ็น
แคดเมียม (cadmium)	- ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม
ตะกั่ว (lead)	- ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม
ปรอท (mercury)	- ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม
สารหนูทั้งหมด (total arsenic)	- ไม่เกิน 2 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม

1.4 รายละเอียดผู้ผลิตหรือผู้นำเข้า

- รายละเอียดผู้ผลิต: ระบุชื่อหน่วยงาน ที่อยู่ และประเทศของผู้ผลิต
- รายละเอียดผู้นำเข้า: ระบุชื่อหน่วยงาน ที่อยู่ และประเทศของผู้นำเข้า

ส่วนที่ 2 ข้อมูลความปลอดภัยและคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

2. ผลการตรวจเอกลักษณ์ของจุลินทรีย์

มีผลการตรวจเอกลักษณ์โดยใช้วิธีการที่ยอมรับและเป็นปัจจุบัน อย่างน้อยถึงระดับสปีชีส์โดยควรมีผลการตรวจทั้งทางลักษณะการแสดงออก (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) เนื่องจากส่วนใหญ่ประโยชน์ที่เกิดขึ้น (probiotic effect) มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ (strain-specific) ดังนั้น จึงควรมีวิธีการตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพและเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาหลังผลิตภัณฑ์ออกสู่ตลาด

2.1 ผลการตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ทางลักษณะ (phenotype)

- ยกตัวอย่างเช่น การย้อมสีกรัม การเจริญในอาหารจำเพาะ (selective media) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) หรือลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ (strain specificity) เป็นต้น

2.2 ผลการตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ทางพันธุกรรม (genotype)

- แบคทีเรีย: ผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing – WGS) ทั้งองค์ประกอบพันธุกรรมของโครโมโซมและนอกโครโมโซม เช่น พลาสมิด (plasmid) เพื่อใช้ในการระบุชนิดของจุลินทรีย์ (taxonomic assignment) โดยสามารถใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การทำ phylogenomics หรือ การหาค่าความเหมือนของลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ (average nucleotide identity: ANI) หรือการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีนที่เหมาะสมในการระบุชนิดของแบคทีเรียนั้นๆ เช่น 16S rRNA gene หรือ housekeeping genes อื่นๆ หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม โดยใช้สายพันธุ์อ้างอิงและฐานข้อมูลที่เหมาะสม (เช่น type strain, reference genome เป็นต้น)
- ยีสต์และรา: ควรมีผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing: WGS) และระบุชนิดโดยวิธีการทาง phylogenomic (เช่น การนำ conserved genes หลายๆ ยีนมาต่อเรียงกันแล้วเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง) กรณีไม่มีผล WGS ควรมีผลเปรียบเทียบความเหมือนของยีนหรือส่วนของสารพันธุกรรมที่เป็นที่ยอมรับว่าสามารถระบุชนิดของยีสต์/รา ในกลุ่มนั้นๆ ได้ (เช่น Internal transcribed spacer region (ITS), ส่วนใดส่วนหนึ่งเช่น D1/D2 region หรือทั้งยีนของ large subunit ribosomal RNA gene 28S rRNA, ยีนที่มีความจำเพาะเช่น tubulin genes เป็นต้น)

ข้อมูลผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing: WGS) ควรมีคุณภาพและความถูกต้องเท่าที่เทคโนโลยีในปัจจุบันสามารถทำได้ ข้อมูลอาจมีรายละเอียดที่แตกต่างกันหากมีเทคโนโลยีใหม่พัฒนาขึ้นในอนาคต อย่างไรก็ตาม หลักการจะยังคงเหมือนเดิม โดยควรให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องตามคำแนะนำของ EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain ของ EFSA (2021) โดยข้อมูลควรประกอบด้วย

1) ข้อความยืนยันว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ WGS เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ยื่นขอ
   - ระบุวิธีการสกัดดีเอ็นเอ โดยควรเลือกใช้วิธีการที่สามารถสกัดได้ดีเอ็นเอทั้งหมดทั้งโครโมโซมและพลาสมิด
2) วิธีการทำ sequencing และการควบคุมคุณภาพ
   - หากวิธีการที่ใช้มีขั้นตอนการคัดเลือกดีเอ็นเอด้วยขนาด (DNA fragmentation and size selection) ต้องมั่นใจว่าวิธีการนั้นไม่ทำให้พลาสมิดขนาดเล็กสูญหายไป
   - ในการทำ base-calling ควรระบุวิธีการและค่าพารามิเตอร์ software และ version ที่ใช้ ลำดับเบสที่ได้ควรมีความครอบคลุม (average read depth) อย่างน้อย 30 เท่าของจีโนม (ควรตั้งเป้าให้ได้ถึง 100 เท่าของจีโนม)
   - ควรมีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอปนเปื้อน ควรมีดีเอ็นเออื่นปนเปื้อนไม่เกินร้อยละ 5 ของลำดับเบสที่อ่านได้ ระบุเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (software, version, parameters รวมถึง database, version และ/หรือวันที่ access หากเกี่ยวข้อง)
3) การประกอบจีโนม (genome assembly)
   - หากเป็นไปได้ควรทำ *de novo* assembly โดยระบุ software, version, parameters ที่ใช้ รวมถึง post-assembly processing (ถ้ามี)
   - ในกรณีที่จำเป็น สามารถใช้จีโนมอ้างอิง (reference-based read mapping) ในการประกอบจีโนม หรือใช้ร่วมกับ *de novo* assembly ในการระบุเอกลักษณ์จุลินทรีย์ได้ ให้ระบุชื่อจีโนมอ้างอิงหรือฐานข้อมูลที่ใช้ เหตุผลในการเลือกจีโนมอ้างอิง ระบุเครื่องมือที่ใช้ทั้ง software, version และ parameters รวมทั้ง สัดส่วนของ reads ที่ map ได้ สัดส่วนของจีโนมอ้างอิงที่ถูก map ด้วยความลึกอย่างน้อย 5 เท่า (5× depth) และค่ากลาง (median depth) ของการ mapping ตลอดความยาวของจีโนม (ข้อสังเกต: วิธีนี้สามารถใช้ในการระบุเอกลักษณ์จุลินทรีย์ได้ แต่ไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความปลอดภัยเนื่องจากอาจมียีนไม่พึงประสงค์อยู่ในจีโนมที่วิเคราะห์แต่ไม่มีในจีโนมอ้างอิง ทำให้จีโนมที่ประกอบขึ้นขาดข้อมูลของยีนที่อาจเป็นอันตรายเหล่านี้ หากใช้วิธีนี้ในการประกอบจีโนม จำเป็นต้องใช้ข้อมูล sequence reads ที่มีความลึกมากกว่า 5 เท่า ในการวิเคราะห์หายีนไม่พึงประสงค์)
   - สำหรับแบคทีเรียควรวิเคราะห์ให้ได้จีโนมที่สมบูรณ์ (complete genome) ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ ร่างจีโนม (draft genome) ที่ได้ ควรมีจำนวน contig ไม่เกิน 50

- สำหรับยีสต์และรา ร่างจีโนมที่ได้ควรมีจำนวน contig ไม่เกิน 1,000 และรายงานสัดส่วนจำนวนยีนที่ highly conserve เช่น BUSCO genes (https://busco.ezlab.org/) ที่พบในจีโนม เพื่อเป็นข้อมูลเกี่ยวกับความสมบูรณ์ของจีโนมที่ได้ จีโนมที่สมบูรณ์ควรมี >90% complete matches กับ BUSCO gene set จากจุลินทรีย์กลุ่มที่ใกล้เคียงที่สุด
- ระบุความยาวรวมของ contig ทั้งหมด (genome size) ควรให้ข้อสังเกตและเหตุผลหากจีโนมที่ assembly ได้มีขนาดแตกต่างจากขนาดจีโนมของสายพันธุ์อื่นในสปีชีส์เดียวกันเกินร้อยละ 20
- หากมีการทำ gene annotation ให้ระบุเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (software, version, parameters รวมถึง database, version และ/หรือวันที่ access หากเกี่ยวข้อง)

4) หลักการใช้ข้อมูล WGS ในการค้นหายีนไม่พึงประสงค์ เช่น ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและสารพิษ
   - วิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน และให้ข้อมูลในลักษณะตารางรายงานโดยระบุชื่อและ accession number หน้าที่ของยีน ระดับความเหมือน (sequence identity) และสัดส่วนความยาว (% coverage) ของยีนที่พบในฐานข้อมูล (subject sequence)
   - ในกรณีการค้นหายีนดื้อยาปฏิชีวนะ (AMR) ควรเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอย่างน้อย 2 แห่ง โดยใช้ค่า threshold ที่ต่ำที่สุดที่มีในฐานข้อมูลนั้น ในกรณีที่ยีนดื้อยาของจุลินทรีย์นั้นไม่มีในฐานข้อมูลหรือมีในจำนวนน้อย (เช่น ในกรณีของโพรไบโอติก) ควรใช้เครื่องมือที่ใช้ Hidden Markov model ช่วยในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้อง
   - โดยทั่วไป ควรรายงานยีนที่พบทั้งหมดที่มีความเหมือนที่ระดับ ≥ 80% identity (ในระดับโปรตีนหรือดีเอ็นเอตามแต่ชนิดของฐานข้อมูล) และครอบคลุมอย่างน้อย 70% ของยีนอ้างอิงในฐานข้อมูล (subject sequence) ในกรณีที่พบว่ามีชิ้นส่วนยีนที่มีความครอบคลุมน้อยกว่า 70% ตั้งแต่ 2 ชิ้นขึ้นไป ที่มีความเหมือน≥ 80% identity กับ AMR ยีนเดียวกัน ในกรณีนี้ควรตรวจสอบว่าชิ้นส่วนเหล่านั้นสามารถประกอบเป็นได้ยีนครบถ้วนหรือไม่และรายงานไว้ด้วย

5) การ submit ข้อมูล WGS ควรส่งข้อมูลในรูปแบบดังต่อไปนี้
   - Sequencing reads ส่งในรูปแบบ FASTQ หรือ equivalent formats (e.g. gzip)
   - Assembled sequences ส่งในรูปแบบ FASTA (*.fasta)
   - Annotation ส่งในรูปแบบ GFF, GenBank, Tabular, และ NCBI's Sequin ASN.1 (.gff, .gbff, .gbk, .gb, .csv, .sqn)

เช็คลิสต์ข้อมูล WGS ที่เกี่ยวข้องสามารถดูได้ใน Appendix A ของเอกสาร EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain ของ EFSA (2021)

ตารางที่ 1 รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (Whole Genome Sequencing; WGS) อ้างอิงตาม EFSA 2021

ชื่อสถาบันที่ทำการวิเคราะห์ (Sequencing Institute)	
ชื่อตัวอย่าง[1], ที่มา (Sample ID[1], obtained from..)	
วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction method)	
วิธีการตัดและคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในการสร้าง library เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส[2] (Library construction protocol, including DNA fragmentation and size selection[2], if applicable)	
เทคโนโลยีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบสายยาว และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Long-read sequencing technology, software including version and relevant parameters)	
เทคโนโลยีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบสายสั้น และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Short-read sequencing technology, software including version and relevant parameters)	
วิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการประกอบจีโนม (Genome assembly, software including version and relevant parameters)	
การปรับแต่งหลังประกอบจีโนม (หากมี) (Post-assembly processing, if applicable)	
เครื่องมือที่ใช้ในการระบุยีน (หากมี) (Gene annotation, software including version and relevant parameters)	
วิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอปนเปื้อน[3] (Contamination in the sequencing reads[3], software, version, parameters)	
ไฟล์ข้อมูลจีโนม, รูปแบบ (WGS file, format)	

[1] ควรระบุให้ชัดเจนว่าสายพันธุ์ที่ระบุในรายงานผลการวิเคราะห์ เป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ยื่นขอการรับรอง Should have a statement confirm that the strain under analysis is the same as the one seeking authorization

[2] ควรเลือกวิธีการที่สามารถวิเคราะห์พลาสมิดขนาดเล็ก (เล็กกว่า 10 kb) ได้ด้วย The protocol should allow for small plasmid (<10 kb) to be included in the sequencing reaction

[3] ควรมีดีเอ็นเออื่นปนเปื้อนใน sequencing reads ไม่เกินร้อยละ 5 หากมีค่าเกินควรให้คำอธิบาย Assigned reads to an unexpected organism should be less than 5%, if not, should provide an explanation

3. ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก

3.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

ข้อมูลการทดสอบการทนต่อสภาวะการเป็นกรด โดยระบุ pH และระยะเวลาที่ทดสอบให้สอดคล้องกับสภาวะในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ โดยระบุเป็นร้อยละของการรอดชีวิตและแสดงวิธีการคำนวณ พร้อมระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

3.2 การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance)

ข้อมูลการทดสอบการทดต่อสภาวะเกลือน้ำดี โดยระบุชนิดและความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ใช้ เช่น bovine หรือ ox gall เป็นต้น และระยะเวลาที่ทดสอบ ให้สอดคล้องกับสภาวะในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ โดยระบุเป็นร้อยละของการรอดชีวิตและวิธีการคำนวณ พร้อมระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

3.3 ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อมูกหรือเซลล์ผิวเยื่อบุของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line)

ข้อมูลการทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อมูกหรือเซลล์ผิวเยื่อบุของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ โดยระบุชนิดของเซลล์ผิวเยื่อบุ (mucus) หรือเซลล์ไลน์ (cell line) ที่ใช้ และวิธีการคำนวณ โดยระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

3.4 ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity)

ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี โดยทดสอบครอบคลุมถึง conjugated bile salts ที่มีในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ โดยระบุชนิดของเกลือน้ำดีที่ใช้ วิธีการทดสอบและวิธีการอ่านผลที่เหมาะสม และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

3.5 คุณสมบัติอื่นๆ (ถ้ามี)

4. ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์

4.1 การดื้อต่อสารปฏิชีวนะ

ต้องมีข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะ ทั้งทาง phenotype และ genotype ดังนี้

4.1.1 การทดสอบฟีโนไทป์

ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration: MIC) ให้แสดงหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยใช้วิธี microdilution method ตามมาตรฐานสากล เช่น Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) หรือมาตรฐาน ISO ที่จำเพาะกับสปีชีส์นั้นๆ หากไม่มีมาตรฐานที่ตรงกับสปีชีส์ให้เลือกใช้มาตรฐานสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่ใกล้เคียงที่สุด โดยระบุไว้ในวิธีการทดสอบและผลการทดสอบด้วย ควรมีการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพและความถูกต้องของความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับจุลินทรีย์อ้างอิงก่อนนำมาใช้ทดสอบ

สำหรับแบคทีเรีย ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ควรทดสอบเป็นอย่างต่ำและวิธีการแปล/อ่านผลดังแสดงในตารางที่ 2 โดยหากมีค่า MIC ≤ ค่า cut-off ในตาราง ให้บันทึกผลเป็น ไวต่อยา (sensitive) หาก MIC > ค่า cut-off ในตาราง ให้บันทึกผลเป็น ดื้อยา (resistance) ในกรณีที่ผลการทดสอบเป็น resistance หมายความว่าสายพันธุ์ (strain) ที่ทดสอบมีความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะนั้นๆ สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในสปีชีส์เดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเป็นความสามารถที่เกิดขึ้นมาภายหลัง (acquire resistance) ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเชิงลึกโดยข้อมูลจีโนไทป์ต่อว่าความสามารถที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากสาเหตุใด และมีโอกาสที่จะถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์อื่นที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้หรือไม่

การดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนในโครโมโซมได้รับการยอมรับว่ามีโอกาสในการถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์อื่นได้น้อยมาก ในขณะที่การดื้อยาที่เกิดจากยีนดื้อยาที่อยู่บน mobile elements เช่น พลาสมิด จะมีความเสี่ยงในการถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์อื่นได้สูง และไม่ควรใช้ในอาหาร เนื่องจากจะเพิ่มความเสี่ยงที่จะเกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคในสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค การพิสูจน์สาเหตุของการดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอด สามารถทำได้โดยวิธีทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) โดยวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม

สำหรับจุลินทรีย์ประเภทยีสต์และรา ควรทดสอบความสามารถในการดื้อยาต้านเชื้อรา (antifungal) ที่ใช้ในทางการแพทย์เพื่อรักษาอาการติดเชื้อจากเชื้อรา อย่างน้อย 3 - 5 กลุ่ม รายงานผลเป็นค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และแปลผลโดยอ้างอิงจากค่า cut off ที่เป็นสากล เช่น Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) หรือ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์นั้นๆ ในกรณีที่ไม่มีค่า cut off ที่ตรงกับสปีชีส์ ให้แสดงค่า MIC และค่า cut off ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด และระบุการเบี่ยงเบนนี้ไว้ในผลการทดสอบด้วย

สำหรับการแปลผลการดื้อยาต้านเชื้อราของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์รา มีความแตกต่างจากแบคทีเรีย เนื่องจาก จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไม่มีความเสี่ยงที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกับ

สิ่งมีชีวิตอื่น จึงไม่จำเป็นต้องพิสูจน์หากลไกการดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอด แต่จะมีความเสี่ยงจากการรักษาที่ล้มเหลวหากมีการติดเชื้อเกิดขึ้นจากตัวจุลินทรีย์เอง ตามข้อกำหนดโพรไบโอติกของ Qualified Presumption of Safety (QPS) ของ European Food Safety Authority (EFSA) ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในร่างกายมนุษย์ (37 องศาเซลเซียส) และนำมาใช้ในลักษณะจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ไม่ควรมีความสามารถในการดื้อยาด้านเชื้อราที่ใช้ในทางการแพทย์

<u>ตารางที่ 2</u> รายชื่อยาต้านจุลชีพและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (mg/L) ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม (EFSA, 2018)

	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Tylosin	Ciprofloxacin	Colistin	Fosfomycin
Lactobacillus obligate homofermentative[(a)]	2	2	16	16	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus acidophilus group	1	2	16	64	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus obligate heterofermentative[(b)]	2	n.r.	16	64	64	1	4	8[(c)]	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus reuteri	2	n.r.	8	64	64	1	4	32	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus facultative heterofermentative[(d)]	4	n.r.	16	64	64	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus plantarum/pentosus	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus rhamnosus	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactobacillus casei/paracasei	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Bifidobacterium	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Pediococcus	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Leuconostoc	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Lactococcus lactis	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Streptococcus thermophilus	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Bacillus	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Propionibacterium	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Enterococcus faecium	2	4	32	1,024	128	4	4	4	16	4	n.r.	n.r.	n.r.
***Corynebacterium* and other Gram-positive**	1	4	4	16	8	1	4	2	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Enterobacteriaceae	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.	n.r.	0.06	2	8

n.r.: not required.
(a): Including *L. delbrueckii, L. helveticus*.
(b): Including *L. fermentum*.
(c): For *L. buchneri* the cut-off for tetracycline is 128.
(d): Including the homofermentative species *L. salivarius*.

4.1.2 การวิเคราะห์ทางจีโนไทป์ เพื่อหายีนดื้อยาปฏิชีวนะโดยใช้ข้อมูล WGS

- วิเคราะห์หายีนดื้อยาปฏิชีวนะ ใช้ฐานข้อมูลที่เหมาะสมและเป็นปัจจุบันอย่างน้อย 2 แห่ง โดยฐานข้อมูลที่ใช้ 1 ฐาน คือ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) โดยเป็นข้อมูลที่ค้นหาไม่เกิน 2 ปี ณ วันที่ยื่นประเมิน พร้อมระบุวันที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูล และให้ระบุชื่อฐานข้อมูลและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการค้นหา การเลือกฐานข้อมูลและการรายงานผลให้ทำตาม หลักการใช้ข้อมูล WGS ในการค้นหายีนไม่พึงประสงค์ด้านบน (ข้อ 2.2 (4)) หากพบยีนดื้อยา ให้ระบุหาตำแหน่งของยีนว่าอยู่ใน mobile element หรือไม่ แบคทีเรียที่มียีนดื้อยาที่สามารถทำงานได้และมีความเสี่ยงในการถ่ายทอดได้สูงไม่ควรถูกนำมาใช้ในห่วงโซ่อาหาร

4.2 การประเมินฤทธิ์ทางแมแทบอลิก

ข้อมูลฤทธิ์ทางแมแทบอลิก เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับการผลิต D-lactate หรือการสลายเกลือน้ำดี โดยระบุวิธีการ สภาวะ ผล และสรุปผล โดยวิธีการที่เหมาะสม

4.3 การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์

ระบุวิธีการ สภาวะ และผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์

4.4 การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด

ระบุวิธีการและผลการเฝ้าระวัง

กรณีที่ยังไม่วางจำหน่าย ให้ระบุแผนการเฝ้าระวัง และวิธีการเก็บข้อมูลหลังการออกจำหน่าย

4.5 การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ

- วิเคราะห์ความสามารถในการสร้างสารพิษและ/หรือสารไม่พึงประสงค์ โดยอาจใช้การวิเคราะห์ข้อมูล WGS (*in silico*) การทดสอบ cytotoxicity ในเซลล์ไลน์ (*in vitro*) หรือในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
- ในกรณีการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูล WGS ควรใช้ฐานข้อมูลที่เหมาะสมกับกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ขอรับการประเมินอย่างน้อย 2 แห่ง โดยฐานข้อมูลที่ใช้ 1 ฐาน คือ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) โดยเป็นข้อมูลที่ค้นหาไม่เกิน 2 ปี ณ วันที่ขอยื่นประเมิน พร้อมระบุวันที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูล การรายงานผลให้ทำตาม หลักการใช้ข้อมูล WGS ในการค้นหายีนไม่พึงประสงค์ ด้านบน (ข้อ 2.2 (4)) หากพบยีน ควรมีผลการทดสอบทางฟีโนไทป์ร่วมด้วย

ตารางที่ 3 รายการยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษและสารไม่พึงประสงค์ที่แนะนำให้ตรวจสอบจากฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Map ID	Name	Gene ID	Enzyme name	Function
Under "Brite" Genes and Proteins; Protein families: Signaling and cellular processes				
Ko02042	Bacterial toxins			Virulence factor
Under "Pathway"				
Carbohydrate metabolism (for D-lactate formation)				
00620	Pyruvate metabolism	K22373	lactate racemase [EC 5.1.2.1]	D-lactate <-> L-lactate
		K03778	D-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.28]	Pyruvate <-> D-lactate
Lipid metabolism (for bile salt deconjugation and secondary bile acid biosynthesis)				
00120	Primary bile acid biosynthesis	K01442	Choloylglycine hydrolase/bile salt hydrolase [EC 3.5.1.24]	Bile salt deconjugation
00121	Secondary bile acid biosynthesis		complete pathway	possible carcinogenic substances
Amino acid metabolism (for biogenic amine formation)				
00310	Lysine degradation	K01582	Lysine decarboxylase [EC 4.1.1.18]	production of cadaverine
		K23385	D-ornithine/D-lysine decarboxylase [EC:4.1.1.116]	production of cadaverine
00330	Arginine and proline metabolism	complete pathway for biogenic amine formation		
		K01583, K01584, K01585, K02626	Arginine decarboxylase [EC 4.1.1.19]	arginine -> agmatine
		K01480	Agmatinase [EC 3.5.3.11]	agmatine -> putrescine
		K00797	Spermidine synthase [EC 2.5.1.16]	putrescine -> spermidine, spermine
		K01476	Arginase [EC 3.5.3.1]	arginine -> ornithine
		K01581	Ornithine decarboxylase [EC 4.1.1.17]	ornithine -> putrescine
00340	Histidine metabolism	K01590	Histidine decarboxylase [EC 4.1.1.22]	histidine -> histamine
00350	Tyrosine metabolism	K22329, K22330, K01592, K18933	Tyrosine decarboxylase [EC 4.1.1.25]	tyrosine -> tyramine
00380	Tryptophan metabolism	K01593	Tryptophan decarboxylase [EC 4.1.1.28]	tryptophan -> tryptamine

จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติกไม่ควรมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษที่เป็นอันตราย สำหรับยีนไม่พึงประสงค์อื่น ให้คำนึงถึงบริบทในการใช้จุลินทรีย์ว่าจะมีผลไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจากการใช้จุลินทรีย์ในสภาวะนั้นๆ หรือไม่

4.6. ฤทธิ์ทางฮีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

- ทดสอบฤทธิ์ทางฮีโมไลติก ระบุวิธีทดสอบ ชนิดหรือแหล่งที่มาของเลือดที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบ

5. ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในต่างประเทศ (ถ้ามี)

5.1 ผลการประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากหน่วยงานที่เป็นสากล

ระบุชื่อหน่วยงาน ปีที่ได้รับการประเมิน และสรุปผลการประเมิน

5.2 ผลการประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากประเทศต่างๆ

ระบุชื่อประเทศ ปีที่ได้รับการประเมิน และสรุปผลการประเมิน