

ภาคผนวก 3

คำอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับข้อมูลประกอบการยื่นขอประเมินความปลอดภัย และคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

1. ผลการตรวจเอกลักษณ์ (identification) ของจุลินทรีย์ และการเรียกชื่อ (nomenclature)

ผลการตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) และสายพันธุ์ (strain) ด้วยวิธีการที่ถูกต้อง และเป็นปัจจุบัน ทั้งลักษณะการแสดงออก (phenotype) และทางลักษณะพันธุกรรม (genotype) และการเรียกชื่อ (nomenclature) ของจุลินทรีย์นั้น ต้องเป็นชื่อวิทยาศาสตร์ที่ยอมรับและใช้อยู่ในปัจจุบัน กรณีมีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ใหม่ให้ระบุชื่อเดิมด้วย พร้อมแหล่งอ้างอิง รวมถึงระบุชื่อที่ใช้ในการค้า (ถ้ามี)

ตัวอย่างแหล่งอ้างอิงการเรียกชื่อจุลินทรีย์ เช่น The International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF) หรือ List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN)

1.1 การตรวจเอกลักษณ์ทางลักษณะการแสดงออก (phenotype)

เช่น การย้อมสีกรัม (gram staining) การเจริญในอาหารจำเพาะ (selective media) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) หรือลักษณะพิเศษของสายพันธุ์ (strain)

1.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางลักษณะพันธุกรรม (genotype) แล้วแต่กรณี ดังนี้

1.2.1 แบคทีเรีย: วิเคราะห์หัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing: WGS) ทั้งองค์ประกอบพันธุกรรมของโครโมโซมและนอกโครโมโซม เช่น พลาสมิด (plasmid) เพื่อใช้ในการระบุชนิด (species) ของจุลินทรีย์ (taxonomic assignment) โดยสามารถใช้เทคนิคต่าง ๆ ที่เหมาะสม เช่น การจัดทำความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenomics) หรือ การหาค่าความเหมือนของลำดับกรดนิวคลีอิก (average nucleotide identity: ANI) หรือการเปรียบเทียบหัสพันธุกรรมของยีนที่เหมาะสมในการระบุชนิด (species) ของแบคทีเรานั้น ๆ (เช่น 16S rRNA gene หรือ housekeeping genes อื่น ๆ) หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม โดยใช้สายพันธุ์อ้างอิงและฐานข้อมูลที่เหมาะสม (เช่น type strain, reference genome เป็นต้น)

1.2.2 ยีสต์และรา: วิเคราะห์หัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing: WGS) และระบุชนิด (species) ของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคการจัดทำความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenomic) กรณีไม่มีผล WGS ควรมีผลเปรียบเทียบความเหมือนของยีนหรือส่วนของสารพันธุกรรมที่เป็นที่ยอมรับว่าสามารถระบุชนิด (species) ของยีสต์หรือราในกลุ่มนั้น ๆ ได้

ทั้งนี้ ผลการวิเคราะห์หัสพันธุกรรมตลอดจีโนม (whole genome sequencing: WGS) ควรมีคุณภาพและความถูกต้องเท่าที่เทคโนโลยีในปัจจุบันสามารถทำได้ โดยอ้างอิงหลักการตาม European Food Safety Authority (EFSA) ฉบับล่าสุด

2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

ทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรด โดยระบุค่า pH และระยะเวลาที่ทดสอบให้สอดคล้องกับสภาวะในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ รายงานผลเป็นร้อยละของการรอดชีวิต และแสดงวิธีการคำนวณ พร้อมระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

2.2 การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance)

ทดสอบการทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี โดยระบุชนิดและความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ใช้ เช่น bovine หรือ ox gall และระยะเวลาที่ทดสอบให้สอดคล้องกับสภาวะในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ รายงานผลเป็นร้อยละของการรอดชีวิต และแสดงวิธีการคำนวณ พร้อมระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

2.3 ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือก หรือ เซลล์ผิวเยื่อของมนุษย์หรือ เซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line)

ทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือกหรือเซลล์ผิวเยื่อของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ โดยระบุชนิดของเซลล์ผิวเยื่อ (mucus) หรือเซลล์ไลน์ (cell line) ที่ใช้ และแสดงวิธีการคำนวณ พร้อมระบุหน่วยให้ชัดเจน และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

2.4 ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity)

ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี โดยทดสอบครอบคลุมถึงเกลือน้ำดี (conjugated bile salts) ที่มีในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ โดยระบุชนิดของเกลือน้ำดีที่ใช้ วิธีการทดสอบ และวิธีการแปลผลที่เหมาะสม และมีข้อมูลเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ควบคุมที่เหมาะสม

2.5 คุณสมบัติอื่น ๆ (ถ้ามี)

ข้อมูลคุณสมบัติอื่น ๆ ของจุลินทรีย์ที่ต้องการประเมิน พร้อมแนบเอกสารอ้างอิงที่น่าเชื่อถือ

3. ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์

ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์ โดยการทดสอบนอกร่างกาย (in vitro) หรือในสัตว์ (in vivo) และการศึกษาในมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัยและปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

3.1 การติดต่อสารปฏิชีวนะ

ผลการทดสอบการติดต่อสารปฏิชีวนะและการถ่ายทอดยีนติดต่อสารปฏิชีวนะโดยเฉพาะสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางคลินิกด้วยวิธีการที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ โดยทดสอบทั้งลักษณะการแสดงออก (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ดังนี้

3.1.1 การทดสอบทางลักษณะการแสดงออก (phenotype)

ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration: MIC) โดยใช้วิธี microdilution method ตามมาตรฐานสากล เช่น Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) หรือ International Organization for Standardization (ISO) ที่จำเพาะกับจุลินทรีย์ชนิด (species) นั้น ๆ กรณีไม่มีมาตรฐานที่จำเพาะ ให้เลือกใช้มาตรฐานสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่ใกล้เคียงที่สุด รายงานผลการทดสอบโดยแสดงหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) หรือ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ทั้งนี้ ให้ทดสอบยืนยันประสิทธิภาพและความถูกต้องของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกับจุลินทรีย์อ้างอิง (QC strain) ก่อนด้วย

ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบและวิธีการแปลผล แล้วแต่กรณี ดังนี้

1) **แบบที่เรื้อย:** ให้อ้างอิงชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบและวิธีการแปลผลตาม European Food Safety Authority (EFSA) ฉบับล่าสุด โดยการแปลผลให้อ้างอิงค่า cut-off ที่จำเพาะกับ จุลินทรีย์ชนิด (species) นั้น ๆ ในกรณีที่ไม่มีค่า cut off ที่จำเพาะ ให้อ้างอิงค่าของจุลินทรีย์กลุ่มที่ใกล้เคียง ที่สุด ทั้งนี้ หากแปลผลได้ว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ยื่นขอประเมินคือต่อสารปฏิชีวนะ (resistance) ต้องทำการ ทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) โดยวิธีทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เพื่อพิจารณาสาเหตุ และความสามารถในการถ่ายทอด

2) **ยีสต์และรา:** ให้ทดสอบกับยาด้านเชื้อรา (antifungal) ที่ใช้ในทางการแพทย์อย่างน้อย 3-5 กลุ่ม และแปลผลโดยอ้างอิงค่า cut off ที่เป็นสากล เช่น Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) หรือ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ที่จำเพาะกับ จุลินทรีย์ชนิด (species) นั้น ๆ ในกรณีที่ไม่มีค่า cut off ที่จำเพาะ ให้แสดงค่า MIC และค่า cut off ของสายพันธุ์ ที่ใกล้เคียงที่สุด ทั้งนี้ หากแปลผลได้ว่าต่อสารปฏิชีวนะ (resistance) ไม่ควรนำมาใช้ในอาหาร โดยไม่ต้อง พิสูจน์หากกลไกการดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอด เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ไม่มีความเสี่ยงที่จะเกิด การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกับสิ่งมีชีวิตอื่น

3.1.2 การวิเคราะห์ทางลักษณะพันธุกรรม (genotype)

วิเคราะห์หายีนต่อต่อสารปฏิชีวนะโดยใช้ข้อมูล WGS และค้นหายีนด้วยฐานข้อมูลที่เหมาะสมและเป็นปัจจุบันอย่างน้อย 2 แห่ง โดยฐานข้อมูลที่ใช้ 1 แห่ง คือ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ทั้งนี้ ข้อมูลที่ค้นหาต้องไม่เกิน 2 ปี ณ วันที่ยื่นประเมิน พร้อมระบุวันที่ทำการ วิเคราะห์ข้อมูลและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการค้นหา ในกรณีที่พบยีนต่อต่อสารปฏิชีวนะ ให้ระบุตำแหน่งของยีน ว่าอยู่ในส่วนที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile element) ด้วยหรือไม่

3.2 การประเมินฤทธิ์ทางเมแทบอลิก

ทดสอบฤทธิ์ทางเมแทบอลิก เช่น การผลิต D-lactate หรือการสลายกลีเซอรีน โดยระบุวิธีการ สภาวะ ผล และสรุปผล โดยวิธีการที่เหมาะสม

3.3 การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์

ทดสอบผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์ โดยระบุวิธีการ สภาวะ และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น หรือใช้ข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ (systematic review) จากหน่วยงานหรือองค์กรที่มี ระบบประเมินความปลอดภัยที่น่าเชื่อถือก็ได้

3.4 การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด

ระบุวิธีการและผลการเฝ้าระวัง กรณีที่ยังไม่วางจำหน่าย ให้ระบุแผนการเฝ้าระวัง และวิธีการเก็บ ข้อมูลหลังการออกจำหน่าย

3.5 การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ

วิเคราะห์ความสามารถในการสร้างสารพิษและหรือสารไม่พึงประสงค์ โดยอาจใช้การวิเคราะห์ ข้อมูล WGS (in silico) การทดสอบ cytotoxicity ในเซลล์ไลน์ (in vitro) หรือในสัตว์ทดลอง (in vivo)

ในกรณีวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูล WGS ให้ค้นหายีนด้วยฐานข้อมูลที่เหมาะสมและเป็นปัจจุบัน อย่างน้อย 2 แห่ง โดยฐานข้อมูลที่ใช้ 1 แห่ง คือ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

ทั้งนี้ ข้อมูลที่ค้นหาต้องไม่เกิน 2 ปี ณ วันที่ยื่นประเมิน พร้อมระบุวันที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการค้นหา หากพบยีนที่เกี่ยวข้อง ควรมีผลการทดสอบลักษณะการแสดงออก (phenotype) ร่วมด้วย

3.6 ฤทธิ์ทางอีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

ทดสอบฤทธิ์ทางอีโมไลติก โดยระบุวิธีทดสอบ ชนิดหรือแหล่งที่มาของเลือดที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบ

4. ผลการประเมินความปลอดภัยและคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในต่างประเทศ หรือข้อมูลสนับสนุนอื่น (ถ้ามี)

ผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากหน่วยงานที่เป็นสากลหรือประเทศต่าง ๆ โดยระบุชื่อหน่วยงานหรือชื่อประเทศ ปีที่ได้รับการประเมิน และสรุปผลการประเมิน หรือข้อมูลสนับสนุนอื่น (ถ้ามี)

หมายเหตุ ความน่าเชื่อถือของเอกสารหลักฐานมีผลต่อการพิจารณา ดังนั้น ผู้ยื่นขอประเมินควรตระหนักและให้ความสำคัญต่อการจัดเตรียมเอกสารหลักฐานประกอบการพิจารณาและการอ้างอิงแหล่งที่มาให้ชัดเจนถูกต้อง เพื่อประโยชน์ของผู้ยื่นคำขอ

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech). ข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement) และหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. Probiotic V.04_04/07/2022.
2. European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA Journal 2018;16(3):5206.
3. European Food Safety Authority (EFSA). Statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. EFSA Journal 2021;19(7):650.