

Received: June 19, 2020; Revised: August 20, 2020; Accepted: November 2, 2020

การต้านยาปฏิชีวนะเชื้อ *Escherichia coli* ที่คัดแยกได้จากมูลโคนม-โคเนื้อ
Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from
manure in dairy and beef cattle

เพ็ญญา เพ็งคำลุน¹ เอกกวี กังขนอก¹ และสุทธิดล ปิยะเดชสุนทร^{1*}Pennapha Pengkhamlun¹, Aekkawee Kangkhonnok¹ and Sudthidol Piyadeatsoontorn^{1*}¹คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์

*Corresponding Author E-mail Address : Sudthidol.ch@muti.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการต้านยาปฏิชีวนะ *Escherichia coli* (*E. coli*) กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากมูลโคนม 4 ตัวอย่าง และมูลโคเนื้อ 3 ตัวอย่าง หาปริมาณความเข้มข้นโคลิฟอร์มของแต่ละตัวอย่างโดยวิธีการตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Standard Plate Count) พบว่าปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยโคลิฟอร์มของกลุ่มการเลี้ยงโคนม 2.75 log CFU/g และกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อ 3.96 log CFU/g นำโคโลนีบริสุทธิ์ของ *E. coli* ที่คัดแยกจากตัวอย่างมูลโคนม-โคเนื้อ ทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด (Oxytetracycline 30 µg, Penicillin G 10 units, Sulfamethoxazole 100 µg, Streptomycin 10 µg และ Enrofloxacin 5 µg) ด้วยวิธีการ Disk Diffusion พบกลุ่มการเลี้ยงโคนมต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 30% และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 70% และกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบการต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 56.67% และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 43.33% จากผลการทดลองสรุปได้ว่าปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยโคลิฟอร์มกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อมากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนม 4.07 log CFU/g ด้วยการทดสอบสถิติ T-test ($p=0.014$) และเมื่อทดสอบด้วยสถิติ Chi-square พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดของ *E. coli* กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ

คำสำคัญ: การต้านยาปฏิชีวนะ *Escherichia coli* มูลโค มูลโคนม มูลโคเนื้อ

Abstract

The aim of this study was to compare the association of antibiotic resistance (AR) of *Escherichia coli* with the dairy-beef cattle groups. Manure samples were randomly collected from Dairy group (Dg) 4 samples, and Beef cattle group (Bg) 3 samples. Standard Plate Count method was used to determine the coliform concentrate, and Disk Diffusion method was used to assess the presence of the multidrug-resistant

to *E. coli* (Oxytetracycline, Penicillin G, Sulfamethoxazole, Streptomycin, and Enrofloxacin). The results from Standard Plate Count method showed that the mean of coliform concentrate was Dg 2.75 log CFU/g, and Bg 3.96 log CFU/g. The results from testing multidrug-resistant of *E. coli* indicated that Dg was 30% of AR and 70% of non-AR resistance, while Bg was 56.67% of AR, and 43.33% of non-AR. In conclusion, the coliform concentrate of the Bg was greater than the Dg 4.07 log CFU/g ($p=0.014$) by T-test statistics. There was no association between antibiotic resistance and the dairy-beef cattle groups by Chi-square- test.

Keywords: Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, Cattle manure, Dairy cattle manure, Beef cattle manure

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาเรื่องการต้านยาปฏิชีวนะมีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก ซึ่งองค์การอนามัยโลก (World health organization; WHO) ได้ตระหนักถึงความสำคัญของการต้านยาปฏิชีวนะในมนุษย์ ได้รณรงค์เรื่องการใชยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง สาเหตุของการต้านยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นนั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องเช่น การรับประทานยาปฏิชีวนะของผู้ป่วยที่เป็นไข้หวัดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ซึ่งไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้เกิดการต้านยา (Fair and Tor, 2014) เป็นต้น การเลี้ยงสัตว์ ฟาร์มโคนม-โคเนื้อเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการต้านยาปฏิชีวนะ เนื่องจากในการเลี้ยงสัตว์นั้น มีการใชยาปฏิชีวนะในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคแอนแทรก โรคคอบวม โรคไข้ชา โรคแท้งติดต่อ สาเหตุหนึ่งที่พบบ่อยในการใชยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนมคือ การรักษาโรคเต้านมอักเสบโดยใชยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams (Kemper, 2008) ซึ่งเมื่อมีการใชยาปฏิชีวนะอย่างไม่สมเหตุสมผลแล้วนั้นทำให้เกิดการต้านยาปฏิชีวนะเกิดขึ้นสามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมในรูปแบบมูลสัตว์และน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียที่มีสภาพต้านยาปฏิชีวนะที่พบในสิ่งแวดล้อมมีถิ่นที่สามารถถ่ายทอดไปสู่สิ่งมีชีวิตสายพันธุ์อื่น (Patermn and Bonomo, 2005) และสามารถถ่ายทอดไปสู่จุลินทรีย์ที่อยู่ในมนุษย์ได้ (Haberecht et al., 2019) โดยน้ำเสียหรือมูลสัตว์ที่นำไปใช้เป็นปุ๋ยสำหรับการเกษตร เมื่อมนุษย์นำพืชผลการเกษตรมาบริโภคก็จะทำให้ได้รับเชื้อแบคทีเรียต้านยาปฏิชีวนะหรือเมื่อน้ำเสียจากฟาร์มถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำ และสัตว์น้ำกินของเสียที่มีการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้เข้าไป และมนุษย์นำสัตว์น้ำนั้นมาบริโภค ทำให้มนุษย์ได้รับแบคทีเรียที่มีการต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปด้วยเช่นกัน เมื่อมนุษย์ใชยาปฏิชีวนะจะทำให้ประสิทธิภาพของยาในการรักษาลดลงจนถึงขั้นรักษาไม่ได้ผล ดังนั้นฟาร์มเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะฟาร์มโคนม-โคเนื้อ ควรต้องทราบหรือมีข้อมูลการต้านยาปฏิชีวนะชนิดที่สำคัญที่มีใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่เกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันรักษาโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค (Pathogen) ชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์และในสัตว์ โดยเฉพาะโรคในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ทั้งนี้เชื้อ *E. coli* มีการตอบสนองที่หลากหลายของเชื้อต่อการต้านยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ (Sobur et al. 2019) ทั้งนี้เชื้อ *E. coli* สามารถเกิดกลไกการต้านยาหลายกลไกและสามารถถ่ายทอดสู่เชื้อแบคทีเรียอื่นได้ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใชยาปฏิชีวนะรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ปัจจุบันข้อมูลที่สำคัญเหล่านี้ที่ยังมีข้อมูลไม่มากพอและยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน ดังนั้นจึงเป็นประเด็นที่นำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อกับการต้านยาปฏิชีวนะ โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างมูลที่เกิดจากกระบวนการการผลิตโคนม-โคเนื้อ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

ออกแบบการทดลองโดยใช้รูปแบบวิจัยเชิงวิเคราะห์ ณ จุดเวลาหนึ่ง (Cross-sectional study; Survey) เพื่อตรวจหาการต้านยาปฏิชีวนะในเชื้อ *E. coli* และวิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโคลิฟอร์มในกลุ่มที่ 1 กลุ่มการเลี้ยงโคนม กลุ่มที่ 2 กลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง ด้วยการทดสอบที (T-test) แบบกลุ่มการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (Independent) ที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อต่อการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-Square test โดยใช้โปรแกรมคำนวณค่าสถิติ Program R version 3.6.3

การเก็บตัวอย่างนำวิเคราะห์

การเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการสุ่มอย่างง่าย (Simple randomization) โดยแบ่งการเก็บมูลโคออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่งคือ กลุ่มการเลี้ยงโคนม เก็บจากมูลโครีดนม ลูกโค โครุ่น โคทราย รวม 4 ตัวอย่าง ๆ ละประมาณ 50 กรัม และกลุ่มที่สองคือ กลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อ เก็บจากมูลโคอุ้มท้อง แมโค ลูกโค รวม 3 ตัวอย่าง ๆ ละประมาณ 50 กรัม เก็บในถุงมือตรวจโรคที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเครื่องมือในการเก็บมูลโคนม-โคเนื้อ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหาปริมาณและคัดแยกเชื้อ *E. coli*

นำตัวอย่างมูลของกลุ่มทดลองแต่ละตัวอย่างแต่ละกลุ่มการทดลองปริมาณ 10 กรัม เพื่อตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์ม ด้วยวิธีการตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Standard Plate Count; SPC) อ้างอิงตามวิธีของ Mark W. Lechevallier et al. (1980) โดยทำละลายตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตน (Buffer peptone water) ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Inoculum) มาทำเจือจาง 10 เท่า (Tenfold dilution) ในสารละลายเปปโตนที่ปราศจากเชื้อ โดยนำสารละลายในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Trypticase soy agar (TSA) โดยวิธีการกระจายเชื้อ (Spread plate) เพื่อนำไปคำนวณปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์ม

การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* โดยนำมูลของกลุ่มทดลองแต่ละตัวอย่างมารวมกัน ในแต่ละกลุ่มการทดลองเป็นหนึ่งตัวอย่าง (Pool sample) ทำการเจือจาง 10 เท่า โดยแต่ละระดับความเข้มข้นของการเจือจางนำมาตรวจหาลักษณะโคโลนีด้วยวิธีการกระจายเชื้อ ตรวจหาโคโลนีที่พบลักษณะ Metallic sheen รูปร่างกลม (Circular) ผิวเรียบ (Smooth) และระดับความนูนของโคโลนีโค้งจากผิวอาหารเล็กน้อย (Convex) ทั้งนี้เลือกเก็บคัดแยกโคโลนี *E. coli* ที่มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน มาแยกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ออกจากโคโลนีของเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มชนิดอื่นโดยวิธีการ Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง EMB (Eosin-methylene blue; HIMEDIA M503) เพื่อยืนยันว่าโคโลนีที่คัดแยกเป็นโคโลนีของ *E. coli* ที่บริสุทธิ์แล้ว โดยแต่ละโคโลนีที่คัดแยกได้นับเป็น 1 ไอโซเลท (Isolate) ทดสอบลักษณะจำเพาะของเชื้อ *E. coli* โดยให้ผลการย้อมสีแกรมลบ ตามวิธีของ Smith and Hussey (2005) ให้ผลบวก MR test และให้ผลลบของ VP test ตามวิธีของ Hudzicki (2009) เก็บโคโลนีบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยกแล้วไว้ในสารละลายเปปโตนที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1,500 ไมโครลิตรผสมกับกลีเซอรอล (Glycerol) 500 ไมโครลิตร นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบันทึกผลการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อ *E. coli* ที่เก็บไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเปปโตน 10 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml นำมา Spread plate และตรวจการต้านยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Disk diffusion ตามวิธีการของ Hudzicki (2009) เพื่อทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 1) Oxytetracycline; OTC 30 µg 2) Penicillin G; P 10 units. 3) Sulfamethoxazol; SXT 100 µg 4) Streptomycin; S 10 µg และ 5) Enrofloxacin; ENR 5 µg โดยเปรียบเทียบขนาดวงใส (Clear zone) รอบ ๆ แผ่นยาปฏิชีวนะและวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) เพื่อแบ่งระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะตามชนิดของยาปฏิชีวนะเทียบกับค่ามาตรฐานของ Clinical and laboratory standards (CLSI) โดยมีเกณฑ์ 3 ระดับ คือ มีความไวต่อยา (Susceptibility; S) มีความไวต่อยาปานกลาง (Intermediate; I) และต้านยา (Resistance; R) และแปลผลการต้านยาปฏิชีวนะดังนี้ OTC 30 µg [S: ≥ 15 , I: 12-14, R: ≤ 11] (CLSI, 2013), P 10 units. [S: ≥ 15 , I: -, R: ≤ 14] (CLSI, 2008), SXT 100 µg [S: ≥ 16 , I: 11-15, R: ≤ 10] (CLSI, 2012), S 10 µg [S: ≥ 15 , I: 12-14, R: ≤ 11] (CLSI, 2008), ENR 5 µg [S: ≥ 21 , I: 17-20, R: ≤ 16] (CLSI, 2013)

ผลการวิจัย

จากการศึกษาการต้านยาปฏิชีวนะเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากมูลโคนม-โคเนื้อพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์มกลุ่มการเลี้ยงโคนมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.75 ± 0.55 log CFU/g และกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.96 ± 0.39 log CFU/g แตกต่างกัน ($p=0.014$) โดยปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์มกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อมากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนม 4.07 log CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้เมื่อนำมาทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk diffusion แล้วนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อกับการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด (Oxytetracycline 30 µg, Penicillin G 10 units, Streptomycin 10 µg, Enrofloxacin 5 µg, Sulfamethoxazole 100 µg) ของเชื้อ *E. coli* พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์ม (CFU/g) ของกลุ่มการเลี้ยงโคนมและการเลี้ยงโคเนื้อ

Experimental group	Coliform concentrations		p-value
	Total Concentrations CFU/g	Log CFU/g (Mean $\pm$ SD)	
Dairy	2.65×10^2 - 3.75×10^3	2.75 ± 0.55	0.014
Beef cattle	5.01×10^3 - 3.42×10^4	$3.96 \pm 0.39^*$	

หมายเหตุ : *ปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์ม log CFU/g ในแนวคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ด้วยการทดสอบทางสถิติ T-test

ตารางที่ 2 ผลของความสัมพันธ์ระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดต่อการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ

Antibiotic	Experimental group	Antibiotic resistance			p-value
		R	I	S	
Oxytetracycline	D	1	0	5	0.540
	B	3	0	3	
Enrofloxacin	D	1	1	4	1.000
	B	0	1	5	
Streptomycin	D	2	4	0	1.000
	B	3	2	1	
Penicillin	D	5	0	1	1.000
	B	6	0	0	
Sulfamethoxazole	D	0	0	6	0.019
	B	5	0	1	
Total					0.068

หมายเหตุ : D; Daily cattle, B; Beef cattle, R; Resistance, I; Intermediate, S; Susceptible

ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-Square test

อภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์มของกลุ่มการเลี้ยงโคนม (2.75 log CFU/g) โคเนื้อ (3.96 log CFU/g) ด้วย T-test มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นโคลิฟอร์มของกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อมากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนม 4.07 log CFU/g ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1 ทั้งนี้เพราะการจัดการฟาร์มมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์มในมูลโคมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับระบบการจัดการ ความหนาแน่นของสัตว์ การจัดการทุ่งหญ้า และปัจจัยอื่น ๆ (Lewis et al., 2005) มีผลต่อการปนเปื้อนโคลิฟอร์มสู่สิ่งแวดล้อม (Quintana et al., 2020) โดยการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำในฤดูฝน (Helard et al., 2019) หรือทุ่งหญ้ารอบฟาร์มในรูปแบบของปุ๋ยคอก (Guber et al., 2006) ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟอร์มของกลุ่มการเลี้ยงโคนมจากการทดลองนี้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Wang et al. (2004) ที่พบว่าโคลิฟอร์มที่แยกได้จากมูลโคนมเป็นเชื้อ *E. coli* (6.55×10^6 CFU/g) และ Streptococci (7.60×10^6 CFU/g) สอดคล้องกับการทดลองของ Sinton et al. (2007) พบว่าปริมาณความเข้มข้นโคลิฟอร์มในมูลโคเนื้อทั้งหมดประมาณ $10^5 - 10^6$ CFU/g มีปริมาณความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อ (3.96 log CFU/g)

จากการทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะและนำข้อมูลมาทดสอบทางสถิติ Chi-square เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อกับการต้านยาปฏิชีวนะ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะสี่ชนิด (Oxytetracycline 30 µg, Penicillin G 10 units, Streptomycin 10 µg และ Enrofloxacin 5 µg) ของเชื้อ *E. coli* กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ และพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ Sulfamethoxazole กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ($p < 0.05$) แต่ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะทั้งห้าชนิดกับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bok et al. (2015) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ทั้งนี้รูปแบบการเลี้ยง วิธีการเลี้ยง การจัดการ เป้าประสงค์การใช้ยา

ชนิดของยาที่มีใช้ในฟาร์ม ลักษณะอาการหรือความเจ็บป่วย โรคที่เกิดขึ้นในฟาร์ม สภาพแวดล้อมฟาร์มที่แตกต่างกัน มีผลต่อการถ่ายทอดปัจจัยความรุนแรงของการต้านยาปฏิชีวนะเชื้อ *E. coli* (Bok et al., 2015; Astorga et al., 2019)

ภาพรวมความสัมพันธ์กันระหว่างกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อกับการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดจากตารางที่ 2 พบว่าการต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Multi-drug antibiotics resistance) ของเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ (9 ไอโซเลท) และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 70 เปอร์เซ็นต์ (21 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Messele et al. (2019) พบว่าไอโซเลทเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Streptomycin, Tetracycline, Sulfamethoxazole) ที่ระดับ 29.17 เปอร์เซ็นต์ (14 ไอโซเลท) และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด ที่ระดับ 70.83 เปอร์เซ็นต์ (34 ไอโซเลท)

จำนวน Multi-drug resistance ของเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคเนื้อการต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ระดับ 56.67 เปอร์เซ็นต์ (17 ไอโซเลท) และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด 43.33 เปอร์เซ็นต์ (13 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zheng et al. (2018) พบว่าไอโซเลทเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคเนื้อต้านยาปฏิชีวนะ (Streptomycin, Tetracycline และ Sulfamethoxazole) ที่ระดับ 50.16 เปอร์เซ็นต์ (158 ไอโซเลท) และไม่ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด ที่ระดับ 49.84 เปอร์เซ็นต์ (157 ไอโซเลท)

การต้านยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ OTC กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มโคนม-โคเนื้อไม่ได้มีผลต่อการต้านหรือไม่ต้านยาปฏิชีวนะ OTC ทั้งนี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากกลไกการตอบสนองของเชื้อ *E. coli* ไม่ได้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของการต้านยาปฏิชีวนะ OTC ในกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ (Astorga et al., 2019) แต่จากการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีหรือไม่มีความสัมพันธ์กับการต้านยาปฏิชีวนะ OTC พบว่าการศึกษาของ Parveen et al. (2006) ฤดูกาลมีความสัมพันธ์กับการต้านยาปฏิชีวนะ OTC.

ในกลุ่มการเลี้ยงโคนมไม่ต้านยาปฏิชีวนะ OTC มีจำนวน 83.33 เปอร์เซ็นต์ (5/6 ไอโซเลท) และที่ต้านยาปฏิชีวนะ OTC มีจำนวน 16.67 เปอร์เซ็นต์ (1/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการการศึกษาของ Shinozuka et al. (2019) พบว่ามีเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ต้านยาปฏิชีวนะ OTC 78.95 เปอร์เซ็นต์ (30/38 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะ OTC 21.05 เปอร์เซ็นต์ (8/38 ไอโซเลท) ที่ใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม ทั้งนี้พบว่าในการรักษาอาการเต้านมอักเสบในโคนม ด้วยยาปฏิชีวนะ OTC ทำให้มีการอักเสบบริเวณเต้านมลดลง (Shinozuka et al., 2019) แต่ไม่ส่งผลให้การต้านยาปฏิชีวนะ OTC ของเชื้อ *E. coli* เพิ่มขึ้น จากการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า ในการใช้ยาปฏิชีวนะ OTC ในฟาร์มโคนมที่ทำการทดลองให้ผลดีกว่า เนื่องจากมีจำนวนไอโซเลทที่ต้านยาปฏิชีวนะ OTC อยู่ในระดับน้อยกว่า ส่วนในกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบว่าการต้านและไม่ต้านยาปฏิชีวนะเท่ากันคือ 50 เปอร์เซ็นต์ (3/6 ไอโซเลท) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Shin et al. (2015) พบเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากมูลโคเนื้อต้านยาปฏิชีวนะ Tetracycline 94.19 เปอร์เซ็นต์ (146/155 ไอโซเลท) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะการทดลอง ระบบการเลี้ยง และการจัดการฟาร์มที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งไอโซเลทของเชื้อ *E. coli* ที่พบสามารถต้านยาปฏิชีวนะ OTC ด้วยสองกลไกหลักคือ กลไกแรก Efflux pump โดย Major facilitator superfamily (MFS) ที่พบในเชื้อ *E. coli* เป็น Secondary active transporter ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ทำหน้าที่ขนส่งยาปฏิชีวนะ OTC ออกนอกเซลล์เชื้อ *E. coli* (Kumar et al., 2013) กลไกที่สองการจำกัดการดูดซึมยา โดยเยื่อหุ้มเซลล์ (Outer membrane) ของเชื้อ *E. coli* มีโครงสร้าง Lipopolysaccharides ที่หนาและกีดขวางโมเลกุลของยาปฏิชีวนะ OTC (Reygaert, 2016) จึงทำให้เชื้อ *E. coli* ต้านยาปฏิชีวนะ OTC

ยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ ENR กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ซึ่งการต้านยานี้ไม่ได้มีความจำเพาะกับรูปแบบหรือวิธีการเลี้ยงการจัดการฟาร์มโคนม-โคเนื้อ เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ENR น้อยมากในฟาร์มโคนม-โคเนื้อ ดังแสดงจากข้อมูลจำนวนไอโซเลทที่ไม่ต้านหรือต้านยาปฏิชีวนะ ENR ในโคนม-โคเนื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ กลุ่มการเลี้ยงโคนมพบว่าไม่ต้านยาปฏิชีวนะ 83.33 เปอร์เซ็นต์ (5/6 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะ 16.66 เปอร์เซ็นต์ (1/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shinozuka et al. (2019) ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากมูลโคนมไม่มีการต้านยาปฏิชีวนะ 100 เปอร์เซ็นต์ (28/28 ไอโซเลท) สำหรับกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบว่าไม่ต้านยาปฏิชีวนะ ENR 100 เปอร์เซ็นต์ (6/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Orden et al. (2001) ที่พบเชื้อ *E. coli* ไม่ต้านยาปฏิชีวนะ 95.10 เปอร์เซ็นต์ และต้านยาปฏิชีวนะ 4.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นวิถีของการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มกับการใช้ยาปฏิชีวนะ ENR ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ENR ยังให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ได้ดี ดังนั้นจึงพบว่าค่าความเข้มข้นของระดับยาปฏิชีวนะ ENR ที่ต่ำที่สุด (Minimum inhibition concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ระดับต่ำที่ 0.022 - 0.030 µg แสดงให้เห็นว่าระดับยาปฏิชีวนะ ENR ที่ใช้ในการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ใช้ยาในระดับต่ำยังสามารถมีประสิทธิภาพที่ดีได้ และการใช้ยาปฏิชีวนะต้องมีความสอดคล้องกันระหว่างค่าระดับ MIC และระดับการต้านยาปฏิชีวนะ และไม่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายยา ซึ่งเป็นกลไกที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นมาต้านยาปฏิชีวนะ ENR โดยยาปฏิชีวนะ ENR จะสามารถเข้าไปในผนังเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถจับกับ Target site ทำให้ไม่สามารถเข้าไปทำลายเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ได้ (Li et al., 2019) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ENR ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ในโคนม-โคเนื้อ เช่น โรคท้องร่วง และปริมาณของยาปฏิชีวนะ ENR ที่แนะนำให้ใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* คือ 12.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสัตว์ (Blondeau et al., 2012) จะให้ผลตอบสนองต่อการกำจัดเชื้อได้ดี

ยาปฏิชีวนะ Streptomycin

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ S กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ แสดงให้เห็นว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ S ในฟาร์มโคนม-โคเนื้อไม่ได้ส่งผลหรือมีความสัมพันธ์กับการต้านยาปฏิชีวนะ S ทั้งนี้เป่าประสงค์ส่วนใหญ่ของฟาร์มจะใช้ยาดังกล่าวเพื่อการรักษาหรือป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น ยาสดเต้านมเพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบ หรือยาสำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพื่อรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร (Pyorala, 2009) ซึ่งการใช้ยาดังกล่าวจะมีการกำหนดการใช้หรือการหยุดยาที่เป็นมาตรฐานของการใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2002) โดยเฉพาะโคนม ดังนั้นจึงทำให้โอกาสที่เชื้อ *E. coli* จะต้านยาปฏิชีวนะ S จำนวนน้อย ดังในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าในกลุ่มการเลี้ยงโคนมไม่ต้านยาปฏิชีวนะ S 66.67 เปอร์เซ็นต์ (4/6 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะ 33.33 เปอร์เซ็นต์ (2/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2018) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากโคนมไม่ต้านยาปฏิชีวนะ S 89.80 เปอร์เซ็นต์ และต้านยาปฏิชีวนะ S 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบว่าต้านยาและไม่ได้ต้านยาปฏิชีวนะ S เท่ากันที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ (3/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aasmae et al. (2019) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมมีการต้านยาปฏิชีวนะ S ที่ระดับ 63.50 เปอร์เซ็นต์ และไม่ได้ต้านยาปฏิชีวนะ S ที่ระดับ 36.50 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายังคงมีการต้านยาปฏิชีวนะ S ทั้งกลุ่มโคนม-โคเนื้อ ซึ่งการต้านยาปฏิชีวนะ S เกิดขึ้นด้วยสองกลไกคือ กลไกแรกการจำกัดการดูดซึมยา โดยเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *E. coli* จะมีโครงสร้าง Lipopolysaccharides ที่หนาทำให้ยาปฏิชีวนะ S ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ได้ (Ruddaraju et al., 2020) และ กลไกที่สองการยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะ Streptomycin โดยทั่วไปด้วยเอนไซม์ Acetyltransferases Nucleotidyltransferases และ Phosphotransferases (Reygaert, 2016) ทั้งนี้เนื่องจากพบจำนวนไอโซเลทของเชื้อ *E. coli* ในสัดส่วนที่ต้านยาปฏิชีวนะค่อนข้างมาก ทั้งนี้เนื่องจากพบจำนวนไอโซเลทของเชื้อ *E. coli* ในสัดส่วนที่ต้านยา

ปฏิชีวนะค่อนข้างมาก ซึ่งปริมาณของยาปฏิชีวนะ S ที่แนะนำให้ใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* ในโคนม-โคเนื้อ คือ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสัตว์ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2002)

ยาปฏิชีวนะ Penicillin G

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ P กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพบว่าวิธีการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มโคนม-โคเนื้อกับการใช้ยา P ไม่ได้ส่งผลทำให้เกิดการไม่ต้านหรือต้านยาปฏิชีวนะ P ทั้งนี้กลุ่มการเลี้ยงโคนมพบว่าไม่ต้านยาปฏิชีวนะ Penicillin G มีจำนวน 16.67 เปอร์เซ็นต์ (1/6 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะมีจำนวน 83.33 เปอร์เซ็นต์ (5/6 ไอโซเลท) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Msolo et al. (2016) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมต้านยาปฏิชีวนะ P 100 เปอร์เซ็นต์ (27/27 ไอโซเลท) สำหรับกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบว่าต้านยาปฏิชีวนะ P มีจำนวน 100 เปอร์เซ็นต์ (6/6 ไอโซเลท) ที่คัดแยกได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Galland et al. (2005) ที่พบว่ามีการต้านยาปฏิชีวนะ P ของเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคเนื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ (57/57 ไอโซเลท) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนม-โคเนื้อพบการต้านยาปฏิชีวนะ P ระดับสูง เนื่องด้วยสองเหตุผลคือ 1) ยาปฏิชีวนะ P เป็นกลุ่มยาที่แนะนำให้ใช้เป็นลำดับแรก (Drug of choice) ในการรักษา 2) มีการใช้ยาปฏิชีวนะ P ในการรักษาโรคติดเชื้อมาเป็นระยะเวลายาวนานและต่อเนื่อง จึงทำให้เกิดการต้านยาปฏิชีวนะ P โดยเฉพาะในกลุ่มเชื้อ *E. coli* โดยเกิดกลไกการต้านยาปฏิชีวนะ P โดยเชื้อ *E. coli* สร้างเอนไซม์ β -lactamases ไปทำลายโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ P ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ดังนั้นเมื่อเกิดสภาวะดังกล่าวจึงไม่แนะนำให้ใช้ยาปฏิชีวนะ P ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในฟาร์มโคนม-โคเนื้อ แต่ทั้งนี้ยังสามารถใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่พัฒนามาจากยาปฏิชีวนะ P ได้เช่น Ampicillin Amoxicillin เป็นต้น ซึ่งจะให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากกว่า (Reygaert, 2016)

ยาปฏิชีวนะ Sulfamethoxazole

จากการทดลองครั้งนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ SXT กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพบว่าวิธีการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มโคนม-โคเนื้อที่แตกต่างกันมีผลต่อการต้านยาปฏิชีวนะ SXT ที่เกิดขึ้น ทั้งนี้พบว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนมพบว่าไม่ต้านยาปฏิชีวนะ SXT 100 เปอร์เซ็นต์ (6/6 ไอโซเลท) สอดคล้องกับการศึกษาของ Msolo et al. (2016) พบว่าไอโซเลทเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมไม่ต้านยาปฏิชีวนะ SXT 81 เปอร์เซ็นต์ (22/27 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะ SXT 19 เปอร์เซ็นต์ (5/27 ไอโซเลท) สำหรับกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อพบว่าไม่ต้านยาปฏิชีวนะ SXT 16.67 เปอร์เซ็นต์ (1/6 ไอโซเลท) และต้านยาปฏิชีวนะ SXT 83.33 เปอร์เซ็นต์ (5/6 ไอโซเลท) สอดคล้องกับการศึกษาของ Carson et al. (2008) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคเนื้อไม่ต้านยาปฏิชีวนะ SXT 11 เปอร์เซ็นต์ และต้านยาปฏิชีวนะ SXT 89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกได้จากฟาร์มโคนมพบการไม่ต้านยาปฏิชีวนะ SXT ระดับสูง ส่งผลให้การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ด้วยยาปฏิชีวนะ SXT ในฟาร์มโคนมจะให้ผลในการกำจัดเชื้อ *E. coli* ได้ดี ในขณะที่ฟาร์มโคเนื้อพบว่าไอโซเลทต้านยาปฏิชีวนะ SXT กลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อต้านยาปฏิชีวนะ SXT มากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนม จึงไม่แนะนำให้ใช้ยาปฏิชีวนะ SXT รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในฟาร์มโคเนื้อเนื่องจากการต้านยาปฏิชีวนะ SXT เกิดขึ้นในระดับสูง ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการเปลี่ยนแปลง Target site ของยาที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นมาต้านยาปฏิชีวนะ SXT โดยยาปฏิชีวนะ SXT จะสามารถเข้าไปในผนังเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถจับกับ Target Site ทำให้ไม่สามารถเข้าไปทำลายเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ได้ (Reygaert, 2016) ซึ่งหากมีการใช้ยาปฏิชีวนะ SXT ปริมาณที่แนะนำให้ใช้คือ 107 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสัตว์

บทสรุป

ปริมาณความเข้มข้นโคลิฟอร์มกลุ่มการเลี้ยงโคเนื้อมากกว่ากลุ่มการเลี้ยงโคนม เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการต้านยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดของเชื้อ *E. coli* กับกลุ่มการเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ข้อเสนอแนะจากการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะ Sulfamethoxazole ในฟาร์มโคนม และยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin ทั้งในฟาร์มโคนม-โคเนื้อ ให้ผลดีต่อการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* และไม่แนะนำให้ใช้ยาปฏิชีวนะ Penicillin ทั้งในฟาร์มโคนม-โคเนื้อ

เอกสารอ้างอิง

- Astorga F., Navarrete-Talloni M.J., Miró M.P., Bravo V., Toro M., Blondel C.J. and Hervé-Claude L.P. (2019). Antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from dairy calves and bedding material. *Heliyon*. 5(11): 1-7.
- Blondeau J.M., Borsos S., Blondeau L.D., Blondeau B.J.J. and Hesje C.E. (2012). Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Veterinary Microbiology*. 160(2): 85-90.
- Bok E., Mazurek J., Stosik M., Wojciech M. and Baldy-Chudzik K. (2015). Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle. *Journal of Environmental Research and Public Health*. 12(1): 970-985.
- Carson C.A., Reid-Smith R., Irwin R.J., Martin W.S. and McEwen S.A. (2008). Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Journal of Veterinary Research*. 72(2): 119-128.
- CLSI. (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd Edition. CLSI document M100-S8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne: PA.
- CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd Edition. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne: PA.
- CLSI. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd Edition. CLSI document M31-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne: PA.
- Fair R.J. and Tor Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 6: 25-64.
- Galland J.C., Hyatt D.R., Crupper S.S. and Acheson D.W. (2005). Prevalence antibiotic susceptibility and diversity of *Escherichia coli* O157: H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 67(4): 1619-1627.

- Guber A.K., Shelton D.R., Pachepsky Y.A., Sadeghi A.M. and Sikora L.J. (2006). Rainfall-induced release of fecal coliforms and other manure constituents: comparison and modeling. *Journal of Microbiology*. 72(12): 7531-7539.
- Haberecht H.B., Nealon N.J., Gilliland J.R., Holder A.V., Runyan C., Oppel, R.C. and Antony L. (2019). Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from environmental waters in Northern Colorado. *Journal of Environmental and public health*. 12(4): 56-73.
- Helard D., Indah S. and Wilandari M. (2019). Spatial distribution of coliform bacteria in Batang Arau River, Padang, West Sumatera, Indonesia. *Journal of Materials Science and Engineering*. 602(1):1-9.
- Hudzicki J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *Journal of American Society for Microbiology*. 208(62). 1-13.
- Kemper N., Farber H., Skutlarek D. and Krieter J. (2008). Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. *Journal of Agricultural Water Management*. 95(11): 1288-1292.
- Kumar S., Mukherjee M.M. and Varela M.F. (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International Journal of Bacteriology*. 1-15.
- LeChevallier M.W., Seidler R.J., Evans T.M. (1980). Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 10(5). 922-930.
- Lewis D.J., Atwill E.R., Lennox M.S., Hou L., Karle B. and Tate K.W. (2005). Linking on-farm dairy management practices to storm-flow fecal coliform loading for California coastal watersheds. *Environmental Monitoring and Assessment*. 107(3): 407-425.
- Li J., Hao H., Dai M., Zhang H., Ning J., Cheng G. and Yuan Z. (2019). Resistance and virulence mechanisms of *Escherichia coli* selected by enrofloxacin in chicken. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 63(5): 18-24.
- Li X., Aly S.S., Su Z., Pereira R.V., Williams D.R., Rossitto P. and Atwill E.R. (2018). Phenotypic antimicrobial resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* from dairy cattle in different management units on a central California dairy. *Journal of Clinical Microbiology*. 7(2): 1-7.
- Msolo L., Igbinosa E.O. and Okoh A.I. (2016). Prevalence and antibiogram profiles of *Escherichia coli* O157:H7 isolates recovered from three selected dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. *Journal of Tropical Disease*. 6(12): 990-995.
- Orden J.A., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Cid D., Díez R., Martínez S. and de la Fuente R. (2001). Quinolone resistance in potentially pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy ruminants. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 48(3): 421-424.
- Parveen S., Lukasik J., Scott T.M., Tamplin M.L., Portier K.M., Sheperd S. and Farrah S.R. (2006). Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. *Journal of Applied Microbiology*. 100(1): 50-57.

- Patermn D.L. and Bonomo R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(4): 657-686.
- Pyorala S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Journal of Irish veterinary journal*. 62(4): 40-44.
- Quintana A.R., Sesena S., Garzon A. and Arias R. (2020). Factors affecting levels of airborne bacteria in dairy farms: A review. *Animals*. 10(3): 1-13.
- Reygaert W.C. (2016). Insights on the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *Advances in Clinical and Medical Microbiology*. 2(1): 1-11.
- Ruddaraju L.K., Pammi S.V.N., sankar Guntuku G., Padavala V.S. and Kolapalli V.R.M. (2020). A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (1): 42-59.
- Shin S.W., Shin M.K., Jung M., Belaynehe K.M. and Yoo H.S. (2015). Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 81(16): 5560-5566.
- Shinozuka Y., Kawai K., Takeda A., Yamada M., Kayasaki F., Kondo N. and Higuchi M. (2019). Influence of oxytetracycline susceptibility as a first-line antibiotic on the clinical outcome in dairy cattle with acute *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*. 81(6): 863-868.
- Sinton L.W., Braithwaite R.R., Hall C.H. and Mackenzie M.L. (2007). Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Environmental Microbiology*. 73(24): 7917-7925.
- Smith A.C. and Hussey M.A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology-ASM Conference for Undergraduate Educators*. 1-9.
- Sobur M.A., Sabuj A.A.M., Sarker R., Rahman A.M.M.T., Kabir S.M.L., Rahman M.T. (2019) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. associated with dairy cattle and farm environment having public health significance. *Veterinary World*. 12(7): 984-993.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2002). Committee for veterinary medicinal product. *Journal of EMEA*. 809(01): 1-6.
- Wang L., Mankin K.R. and Marchin G.L. (2004). Survival of fecal bacteria in dairy cow manure. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. 47(4): 1239-1246.
- Zheng J.S., Zhu T.T., Liu Y., Liu T., Li Y.Q., Zhang Z. and Yu L. (2018). An Epidemiological study of drug resistance and resistance genes in bovine *Escherichia coli* Isolates in Heilongjiang Province of China. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46(1): 1-9.