Thesis Title Antimicrobial Residue and Prevalence of Indicator Bacteria Having Antimicrobial Resistance Isolated from Marketed Poultry in Kathmandu, Nepal

Author Mr. Kamal Raj Acharya

Degree Master of Veterinary Public Health

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr Reinhards Fries Advisor (FU-Berlin)

Dr Prapas Patchanee Advisor (CMU)

ABSTRACT

Antimicrobial residue in poultry with the development and dissemination of antimicrobial resistance bacteria via food of animal origin is a big threat to veterinary practices and public health in Nepal. The antimicrobials residue in poultry can exert detrimental effect on human health owing to specific toxicity, drug allergy, and development of drug resistance and evolvement of multi drug resistant strains of bacteria. Microbes related to poultry such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. acquire resistance genes, through selective pressure or induction or mutation. Antimicrobial genes of bacteria can be transmitted horizontally and vertically to other bacteria and can enter the human food chain. With weak control on the use of antimicrobials, ineffective biosecurity and poor slaughterhouse hygiene, poultry consumers in Nepal are at risk. A proper scientific study to assess the prevalence of antimicrobial residues in foods of poultry origin and antimicrobial resistance in some indicator microbes from poultry is essential to assess the seriousness of the situation and hence to develop proper control measures. This study aimed at the prevalence of antibiotics residue and to find out the antimicrobial resistance status of indicators (*E. coli* and *Salmonella* spp.) isolated from poultry.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A cross sectional study was done in three districts of Kathmandu Valley. A baseline survey was conducted with the slaughter house, farmers and drug dealers using questionnaires and semi-structured interviews. Three plate test (Dreiplatten test) and further identification tests were investigated for drug residue analysis. Isolation and identification of indicator bacteria was done by conventional microbiological methods followed by biochemical confirmation. Drug susceptibility test for ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, ceftriaxone, cotrimoxazole, sulphonamides, enrofloxacin and streptomycin was done using disc diffusion method. Represented isolates of both *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. were further analysed for detection of antimicrobial drug resistant genes by polymerase chain reaction (PCR) including aminoglycosides resistance genes (*str*A, *aad*A2,*aph*A1), β-lactams resistance genes (*bla*CMY-2, *bla*PSE1 and TEM*bla*), sulphonamide resistance genes (sul1), tetracycline resistance gene [tetA(B)]and integrase genes of class 1 and 2 integrons (intl1 and intl2, respectively).

Antimicrobial drug residue was found in 30.9% (CI: 26.3% : 35.5%) of all the poultry samples. 23.4%, 16.9% and 11% of samples were positive for β-lactams/tetracyclines group, sulphonamides/trimethoprim group, and aminoglycosides/macrolides group respectively. Antimicrobial drug residue found in liver was significantly higher than in muscle for the same poultry sample ($p<0.05$). In 42.9% of the positive samples multiple drug residues were present. Overall, the prevalence of antimicrobial drug residue found in liver tissue sample was significantly higher than in muscle tissue ($p<0.05$). Antimicrobial drug residue for tetracycline (14.8%) presented as a majority followed by sulphonamides (8.8%), trimethoprim (7.3%), aminoglycosides (6.8%), penicillin (6.2%) and macrolides (3.4%) in liver tissue samples. In muscle tissue samples, the prevalence was highest for tetracycline (10.4%), followed by trimethoprim (5.2%), aminoglycosides (3.9%), sulphonamides (3.6%), macrolides (2.6%) and penicillin (2.1%).

The contaminated rate of *Escherichia coli* on poultry was 76.1%(CI: 71.9% :80.4%) which was significantly higher than *Salmonella* spp. 4.9%(CI: 2.8% :7.10%) ($p<0.05$). *Salmonella* Typhimurium was the most prevalent serovar (72.8%), other serovars were *Salmonella* Fyris (6.9%), *Salmonella* Bareilly *(9.1%)*,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Salmonella Agona (4.6%), *Salmonella* Newport, *Salmonella* Hadar, and *Salmonella* Cholerasuis. Of 316 *E. coli* isolates, 3.2% were pan-susceptible to antimicrobial tested, 2.5% intermediate resistant, and 94.3% resistant to one or more antimicrobials tested. Resistance to tetracycline was highest (87.7%) compared to the lowest as ceftriaxone (1%). Except for ceftriaxone and chloramphenicol (29.7%), resistance to all other antimicrobials was more than 50%. Intermediate resistance to streptomycin (23.5%) and enrofloxacin (14.5%) was higher whereas the intermediate resistance was less than 5% to other antimicrobials tested. 85.1% (CI: 81.2% : 89.1%) of the strains were multiple drug resistant (MDR). 20.3% were resistant to six of the antimicrobials tested. Of 49 *Salmonella* spp. isolates, 26.6% showed resistance to one or more antimicrobials. No resistance to chloramphenicol and ceftriaxone was detected. Resistance was high to ampicillin (12.3%). resistance to six of the antimicrobials was less than 5%. Intermediate resistance was high to ceftriaxone (26.5%) followed by streptomycin (18.4%), ampicillin (10.2%), enrofloxacin (4.1%) and chloramphenicol (2.1%). Except for ceftriaxone and streptomycin the prevalence of resistance was significantly different between *E. coli* and *Salmonella* spp. for all the tested antimicrobial agents ($p<0.05$).

The prevalence of class 1 integrons was high in *E. coli* (37.8%) while the prevalence of class 2 integrons (33.3%) and *bla*CMY2 (36.7%) was high in *Salmonella* spp. No *bla* PSE, *oxa-2* and *sul*1 genes were detected in both bacterial species. Only three out of all 11 genes were found in *Salmonella* spp. in contrast to *E. coli* where 8 genes were presented among the representing *E. coli* strains.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

This study showed that the prevalence of antimicrobial drug residue is significantly high and concentration of drug resistance genes in indicator bacteria in Kathmandu Valley is remarkably extensive. Even, the prevalence of mobile genetic element (integrons) is alarming. It can be concluded that the consumers are at risk in the form of both antibiotic drugs residue and resistant microbes. The finding can be used as baseline information for the policy makers to formulate guidelines to contain antimicrobial use in food animals and hence protect public health.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ สารปฏิชีวนะตกค้างและความชุกของเชื้อแบคทีเรียบ่งชี้ซึ่งมีความต้านทานสารปฏิชีวนะเพาะแยกจากสัตว์ปีกที่วางจำหน่ายในท้องตลาดเมืองกาฐมาณฑุ,ประเทศเนปาล

ผู้เขียน นายคามาล ราจ อชารยา

ปริญญา สัตวแพทย์สาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. ไรฮาร์ด ฟริส อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก (FU-Berlin)

อ.น.สพ.ดร.ประภาส พัชนี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก (CMU)

บทคัดย่อ

ยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อไก่ การพัฒนาและการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจากการบริโภคอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นภาวะคุกคามต่อระบบงานสัตวแพทย์และสาธารณสุขในประเทศเนปาล ยาปฏิชีวนะตกค้างก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ ทั้งในแง่ความเป็นพิษของยา การเกิดภาวะภูมิแพ้ และยังเป็นสาเหตุโน้มนำต่อการเกิดแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ เชื้อจุลชีพที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตสัตว์ปีก เช่น เอสเชอริเชีย โคไล และ ซัลโมเนลล่า ได้รับยีนดื้อยาปฏิชีวนะจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะระหว่างเชื้อแบคที่เรียสามารถเกิดขึ้นได้ในลักษณะทั้งทางแนวขวางและแนวดิ่ง รวมทั้งสามารถที่จะเข้าสู่วงจรอาหารของมนุษย์ได้ จากการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะที่ขาดความเข้มงวด การไม่มีประสิทธิภาพของระบบป้องกันทางชีวภาพในระบบการฆ่าชำแหละ การบริโภคไก่ของประชาชนเนปาลอยู่ในภาวะมีความเสี่ยง การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสมในการประเมินความชุกของยาปฏิชีวนะตกค้างในอาหาร และความชุกของการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อจุลชีพจากไก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จึงมีความจำเป็นต่อการประเมินความรุนแรงของสถานการณ์และเพื่อการพัฒนามาตรการควบคุมป้องกันอย่างเหมาะสม การศึกษานี้ มีจุดประสงค์เพื่อหาความชุกของยาปฏิชีวนะตกค้างและความชุกของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะได้แก่ เอสเชอริเชีย โคไล และ ซัลโมเนลล่า จากตัวอย่างเนื้อไก่

ได้ทำการศึกษาภาคตัดขวางในสามอำเภอของ Kathmandu Valley และทำการสำรวจข้อมูลพื้นฐานของโรงฆ่าสัตว์ เกษตรกรผู้เลี้ยง ตัวแทนจำหน่ายยาปฏิชีวนะ โดยใช้แบบสอบถามและการสัมภาษณ์กึ่งทางการ ทำการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยการทดสอบ 3 plate การจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย การประเมินด้วยวิธีการเพาะเชื้อทางจุลชีพแบบดั้งเดิมและยืนยันผลด้วยวิธีการทางชีวเคมี การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะได้แก่ ampicillin tetracycline chloramphenicol ceftriaxone cotrimoxazole sulphonamides enrofloxacin และ streptomycin ได้รับการประเมินด้วยวิธี disc diffusion รวมถึงได้ทำการวิเคราะห์ถึงการปรากฏของยีนดื้อยาปฏิชีวนะจากตัวแทนตัวอย่างเชื้อจุลชีพ เอสเชอริเชีย โคไล และ ซัลโมเนลล่า ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ได้แก่ ยีน aminoglycosides resistance genes (*str*A, *aad*A2,*aph*A1), β-lactams resistance genes (bla_{CMY-2}, bla_{PSE1} และ TEM*bla*), sulphonamide resistance genes (sul1), tetracycline resistance gene [tetA(B)] และ integrase genes of class 1 และ 2 integrons (intl1 และ intl2 ตามลำดับ)

จากการศึกษาพบว่า 30.9% (CI: 26.3% : 35.5%) ของตัวอย่างเนื้อไก่ มียาปฏิชีวนะตกค้าง โดย 23.4% เป็นชนิด β-lactams/tetracyclines 16.9% เป็นชนิด sulphonamides/trimethoprim และ 11% เป็นชนิด aminoglycosides/macrolides ตามลำดับ การตกค้างของยาปฏิชีวนะที่พบในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับมีสัดส่วนสูงกว่าที่พบในตัวอย่างกล้ามเนื้อจากตัวอย่างไก่ตัวเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า 42.9% ของตัวอย่างที่มียาปฏิชีวนะตกค้าง พบยาปฏิชีวนะตกค้างมากกว่าหนึ่งชนิด ยาปฏิชีวนะตกค้างที่พบมากที่สุดได้แก่ยา tetracycline (14.8%) ตามด้วย sulphonamides (8.8%) trimethoprim (7.3%) aminoglycosides (6.8%) penicillin (6.2%) และ macrolides (3.4%) ในเนื้อเยื่อตับ และพบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างกล้ามเนื้อ ที่สูงที่สุดได้แก่ tetracycline (10.4%) ตามด้วย trimethoprim (5.2%) aminoglycosides (3.9%) sulphonamides (3.6%) macrolides (2.6%) และ penicillin (2.1%)

อัตราการปนเปื้อนเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล ในตัวอย่างเนื้อไก่ มีค่าเท่ากับ 76.1% (CI: 71.9% :80.4%) ซึ่งสูงกว่า ซัลโมเนลล่า อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 4.9% (CI: 2.8% :7.10%) ($p<0.05$) จากจำนวนเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล 316 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 3.2% ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทำการทดสอบ 2.5% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะระดับปานกลาง และ 94.3% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดที่ทำการทดสอบ และพบว่าการดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline ของเชื้อ เอสเชอริเชีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคไล มีค่าสูงที่สุดที่ 87.7% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ต่ำที่สุดของยา ceftriaxone ที่ 1% และการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เหลือทั้งหมด มีค่ามากกว่า 50% ยกเว้น ceftriaxone และ chloramphenicol (29.7%) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะระดับปานกลางของเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล ต่อยา streptomycin (23.5%) และ enrofloxacin (14.5%) มีสัดส่วนที่สูง ในขณะที่ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะระดับปานกลางมีค่าน้อยกว่า 5% ต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบชนิดอื่นๆ จากการศึกษาพบว่า 85.1% ของเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล เป็นชนิดดื้อต่อยาหลายชนิด (MDR) โดยที่ 20.3% ดื้อต่อยาจำนวน 6 ชนิด ที่ทำการทดสอบ และจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อซัลโมเนลล่า จำนวน 49 ตัวอย่าง พบว่า 26.6% เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด และ เชื้อซัลโมเนลล่า ทั้งหมดไวต่อยา chloramphenicol และ ceftriaxone การดื้อต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 6 ชนิด มีค่าน้อยกว่า 5% และการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดปานกลาง พบในสัดส่วนที่มีค่าสูง ต่อยาปฏิชีวนะ ceftriaxone (26.5%) ตามด้วย streptomycin (18.4%), ampicillin (10.2%), enrofloxacin (4.1%) และ chloramphenicol (2.1%) ความชุกของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ระหว่าง เอสเชอริเชีย โคไล และ ซัลโมเนลล่า มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นยาปฏิชีวนะ ceftriaxone และ streptomycin

ความชุกของ class 1 integrons ที่พบในเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล มีค่าสูงถึง 37.8% โดยพบว่าความชุกของ class 2 integrons และ bla_{CMY2} ในเชื้อซัลโมเนลล่า มีค่าสูงถึง 33.3% และ 36.7% ตามลำดับ จากการศึกษาไม่พบยีนดื้อยา bla_{PSE}, *oxa-2* และ *sul*1 ในเชื้อจุลชีพทั้ง 2 ประเภท และจากการตรวจหาทั้งสิ้น 11 ยีนดื้อยาพบเพียง 3 ยีนดื้อยา จากตัวอย่างเชื้อซัลโมเนลล่า และ 8 ยีนดื้อยา จากตัวอย่างเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล

จากการศึกษาพบ ความชุกของยาปฏิชีวนะตกค้างและยีนดื้อยาของเชื้อจุลชีพ ในสัดส่วนที่สูง จากตัวอย่างที่เก็บใน Kathmandu Valley นอกจากนี้ การพบยีน integrons จากเชื้อจุลชีพบ่งชี้จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญ และการศึกษานี้สรุปได้ว่า ผู้บริโภคมีความเสี่ยงทั้งในรูปแบบของยาปฏิชีวนะตกค้างและเชื้อที่ดื้อที่ต่อยาปฏิชีวนะ ข้อมูลจากการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญ และเป็นแนวทางในการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์บริโภคและเพื่อความปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved