

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: VU MINH DUC

題 目 : STUDIES ON THE TRANSITION IN SEROVARS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF SALMONELLA ISOLATED FROM BROILER CHICKENS IN KAGOSHIMA, JAPAN

(鹿児島肉用鶏から分離されたサルモネラにおける血清型と抗菌剤耐性の推移に関する研究)

論文要旨 :

Salmonella is an enteric pathogen that can infect almost all animals and humans. Foodborne salmonellosis is the most relevant source with a high global impact on human health. It was estimated that non-typhoidal Salmonella causes around 93.8 million illnesses and 155,000 deaths each year all over the world. There are two species in this genus, enterica, and bongori. Salmonella enterica is the main serovars implicated in Salmonella infections in both humans and poultry worldwide.

Nowadays, Salmonella contamination has been a continuous problem in the poultry industry. Therefore, many countries have a national program to monitor and control Salmonella on poultry. In this thesis we present studies on prevalence, serovars changing, and antimicrobial resistance to continue research on Salmonella in broiler chickens in Kagoshima Prefecture, Japan.

In the period from 2009 to 2012, we conducted research about the prevalence, serovars, and antimicrobial resistance of Salmonella isolates from 192 broiler flocks and 3071 cecal samples. Among the tested farms, 49.0% of flocks were positive for Salmonella, and 243 isolates were obtained from samples 7.9%. All the Salmonella isolates were one of three serovars: S. Infantis (57.6%; 140/243), S. Manhattan (40.3%; 98/243) and S. Schwarzengrund (2.1%; 5/243). The proportion of S. Infantis isolates decreased from 66.0% in 2009 to 50.0% in 2011 but increased to 57.6% in 2012, while the proportion of S. Manhattan isolates significantly increased from 26.4% to 50% from 2009 to 2011, and decreased moderately to 40.9% in 2012. Most of the recovered Salmonella isolates were resistant to three antimicrobials, i.e., streptomycin (95.1%), sulfamethoxazole (91.0%) and oxytetracycline (91.4%). In contrast, all Salmonella strains were susceptible to chloramphenicol. Comparison of this study to previous studies of the antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates showed that: the percentage of antibiotic-resistance isolates increased dramatically for two antibiotics, ampicillin (from 22.4% to 55.1%) and

cefotaxime (from 9.1% to 52.7%). In contrast, the percentage of ofloxacin-resistant isolates decreased across the three survey periods, from 20.8% in 2004-2006 to 1.6% in the present study period (2009-2012). In addition, *S. Infantis* exhibited a variety of resistance to antimicrobials examined from sensitivity to resistance to eight antimicrobials. Multidrug resistance to more than 6 six antimicrobials was detected in 113 (46.5%) of the isolates, and most of them were *S. Manhattan*.

In the period between 2013 and 2016, we analyze the *Salmonella* serovars, measure the minimum inhibitory concentration of antimicrobials, and examine the antimicrobial resistance genes of *Salmonella* isolated from 192 broiler flocks and 3069 cecal samples. The result showed that *S. Schwarzengrund* prevalence had increased annually from 2.1% in (2009-2012) to 21.3% in (2013 – 2016). Compared to the result of chapter 1, ampicillin-, cefotaxime-, and ceftiofur-resistance showed a dramatic decrease trend. But the proportion of kanamycin-resistance increased sharply.

Most of the recovered *Salmonella* isolates in this study were resistant highly to three antimicrobials, i.e., streptomycin, sulfamethoxazole, and oxytetracycline. In contrast, all *Salmonella* strains were susceptible to chloramphenicol and ofloxacin. In detail, different resistance characteristics were observed for each serovar. *S. Schwarzengrund* were sensitive to ampicillin, cefotaxime, and cefoxitin but resistant to kanamycin at 47.7%. On the other hand, *S. Manhattan* and *S. Infantis*, were resistant to the first three kinds of antibiotics listed above (from 10.3% to 45.2%), and sensitive to kanamycin at 1.1% and 10.8%, respectively. Among a total of 68 *Salmonella* strains were resistant to kanamycin, 65 strains which showed MIC value higher than 512 $\mu$ g/ml carried *aphA1* gene, with the. However, 3 strains that showed MIC value at 256 $\mu$ g/ml and 128 $\mu$ g/ml did not carry the *aphA1* gene.

In conclusion, *Salmonella* serovars during the phase of our research from 2009 to 2016 belonged to three serovars: *S. Infantis*, *S. Manhattan*, and *S. Schwarzengrund*. But, from 2009 to 2012, the main serovars isolated were *S. Manhattan* and *S. Infantis*. However, from 2013 to 2016 *S. Schwarzengrund* increased drastically. In all the period of the study, most of the isolates were resistant to streptomycin, sulfamethoxazole, and oxytetracycline. In contrast, most of the isolates were sensitive to chloramphenicol and ofloxacin. Antimicrobial resistance proportion of beta-lactam group (ampicillin, cefotaxime, cefoxitin, and ceftiofur) was high in the period from 2009 to 2012 but decreased in the period from 2013 to 2016. In opposite, the kanamycin-resistant percentage was very low in the first study (2009 - 2012) but increased in the next period (2013 – 2016). Among the kanamycin-resistant *Salmonella* isolates, *aphA1* constituted the main resistance gene detected. It was revealed that the serovar and antimicrobial resistance changed significantly around 2012 in *Salmonella* isolated from broiler chickens in Kagoshima, Japan.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Vu Minh Duc
審 査 委 員	主 査： 鹿児島大学 教授 中馬 猛久
	副 査： 山口大学 教授 豊福 肇
	副 査： 鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査： 鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副 査： 鹿児島大学 准教授 小尾 岳士
題 目	STUDIES ON THE TRANSITION IN SEROVARS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF <i>SALMONELLA</i> ISOLATED FROM BROILER CHICKENS IN KAGOSHIMA, JAPAN (鹿児島肉用鶏から分離されたサルモネラにおける血清型と抗菌剤耐性の推移に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>サルモネラは、多くの動物や人に感染する可能性のある病原細菌である。食中毒としてのサルモネラ症は人間の健康に大きな影響を与えることから、食鳥肉のサルモネラ汚染は公衆衛生および家禽産業において継続的な問題となっている。したがって、多くの国で家禽のサルモネラ汚染を監視および管理するためのプログラムが立案されている。この論文では、我が国有数の養鶏地域である鹿児島県におけるブロイラーのサルモネラ汚染実態を把握するため、保菌率、血清型の変化、および抗菌薬耐性に関する調査を実施した。</p> <p>2009年から2012年の間にブロイラー192鶏群、盲腸内容物3071検体から分離されたサルモネラの保菌率、血清型、および抗菌薬耐性を調査した。その結果、鶏群の49.0%、盲腸検体の7.9%がサルモネラ陽性であり、分離菌株として243株が得られた。すべてのサルモネラ分離株は、<i>S. Infantis</i> (57.6% ; 140/243)、<i>S. Manhattan</i> (40.3% ; 98/243) および <i>S. Schwarzengrund</i> (2.1% ; 5/243) の3つの血清型に分類された。<i>S. Infantis</i> 株の割合は2009年から2012年にかけて66.0%から57.6%であった。<i>S. Manhattan</i> 株の割合は2009年から2011年にかけて26.4%から50%に大幅に増加し2012年には40.9%にやや減少した。回収されたサルモネラ分離株のほとんどは3種の抗菌剤すなわちストレプトマイシン(95.1%)、スルファメトキサゾール(91.0%) およびオキシテトラサイクリン(91.4%)に耐性を示した。対照的に、すべてのサルモネラ菌株はクロラムフェニコールに感受性であった。この結果を2004年から2006年の調査と比較すると、耐性分離株は、アンピシリン(22.4%から55.1%)とセフトキシム(9.1%から52.7%)の2種の抗菌剤に対する耐性</p>	

2,000字以内

が劇的に増加していた。対照的に、オフロキサシン耐性株の割合は、2004 年から 2006 年の 20.8%から本調査期間 (2009~2012) で 1.6%と低下した。血清型で特徴的な耐性パターンが認められ、*S. Infantis* は 8 種の抗菌剤に対するさまざまな耐性パターンを示し、*S. Manhattan* 株のほとんどでは 6 種以上の抗菌剤に対する多剤耐性が認められた。

2013 年から 2016 年の間の 192 のブロイラー鶏群と 3069 検体の盲腸内容物から分離されたサルモネラの血清型を型別し、抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定、さらに抗菌剤耐性遺伝子を調査した。その結果、*S. Schwarzengrund* の検出率は 2009~2012 年の 2.1%から 21.3%と大きく増加した。*S. Manhattan* の検出率は 51.8%で大きく変化せず、*S. Infantis* は 26.9%へ減少した。抗菌剤耐性状況を第 1 章と比較すると、アンピシリン、セフトキシム、およびセフトフル耐性は劇的な減少傾向を示した。一方、カナマイシン耐性の割合は急激に増加した。本調査で分離されたサルモネラ株のほとんどは、3 種の抗菌剤すなわちストレプトマイシン、スルファメトキサゾール、およびオキシテトラサイクリンに対して耐性であった。対照的に、すべてのサルモネラ菌株はクロラムフェニコールとオフロキサシンに感受性であった。血清型ごとに異なる耐性パターンが認められたことが特徴的であった。*S. Schwarzengrund* は、アンピシリン、セフトキシム、およびセフトキシチンに感受性を示したが、47.7%がカナマイシンに耐性を示した。一方、*S. Manhattan* と *S. Infantis* は、上記の最初の 3 種の抗菌剤すなわち  $\beta$  ラクタムに耐性 (10.3%から 45.2%) が認められ、カナマイシンにはそれぞれ 1.1%と 10.8%が耐性であった。計 68 株のサルモネラがカナマイシンに耐性を示し、512  $\mu\text{g/ml}$  を超える MIC 値を示した 65 株が *aphA1* 遺伝子を保有していたが、256  $\mu\text{g/ml}$  と 128  $\mu\text{g/ml}$  の MIC 値を示した 3 株は *aphA1* 遺伝子を保有していなかった。

本論文では、2009 年から 2016 年までの調査期間において、飼育段階のブロイラーを汚染していたサルモネラの血清型は、*S. Infantis*、*S. Manhattan* と *S. Schwarzengrund* の 3 つと判明した。しかし、2009 年から 2012 年にかけて分離された主な血清型は *S. Manhattan* と *S. Infantis* であった。一方 2013 年から 2016 年にかけて、*S. Schwarzengrund* が急激に増加した。研究のすべての期間で、ほとんどの分離株はストレプトマイシン、スルファメトキサゾール、およびオキシテトラサイクリンの 3 剤に耐性を示した。対照的に、ほとんどの分離株はクロラムフェニコールとオフロキサシンに感受性であった。 $\beta$  ラクタム系抗菌剤 (アンピシリン、セフトキシム、セフトキシチン、セフトフル) の抗菌剤耐性率は、2009 年から 2012 年にかけて高かったが、2013 年から 2016 年にかけて減少した。逆に、カナマイシン耐性率は最初の調査期間 (2009 年から 2012 年) から、次の期間 (2013 年から 2016 年) にかけて増加した。カナマイシン耐性サルモネラが保有する主要な耐性遺伝子は *aphA1* であった。鹿児島県のブロイラーから分離されたサルモネラ菌では、2012 年頃に血清型と抗菌剤耐性が大幅に変化したことが明らかになった。

これらの研究成果により、ブロイラーの飼育段階におけるサルモネラ汚染状況が詳細に明らかになり、抗菌剤に対する感受性の変化と血清型の変遷の関係、抗菌剤耐性獲得メカニズムの一端が遺伝子レベルで明らかとなった。以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として妥当なものであると認める。