https://doi.org/10.52326/ismv2024.12
CZU: 619:614.31:637.54

PREVALENȚA BACTERIILOR DIN FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE ȘI GENUL CAMPYLOBACTER ÎN CARNEA DE PASĂRE

Valentina CRETU[1], Adriana ANIȚĂ[2], Nicolae STARCIUC[1], Cristina RÎMBU[2], Dragoș ANIȚĂ[2], Maxim BÎRSA[1]
[1]*Universitatea Tehnica A Moldovei*
[2]*Universitatea pentru Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad" din Iași*

Abstract. Bacteria from the *Enterobacteriaceae* family are some of the most frequently isolated from fresh meat of domestic animals and poultry. In some situations, pathogenic forms including those with zoonotic potential, could predominate in fresh poultry meat. For these reasons, the purpose of our research was to identify bacteria from the family *Enterobacteriaceae* and genus *Campylobacter* in fresh poultry meat. The investigations were focused on the microbiological study of fresh meat samples taken from a slaughterhouse placed in mun. Chisinau, taking into account several points of the technological cycle.

For the identification of bacteria, samples were performed on different selective and differential culture media. The identification of the types of bacteria (colonies) was made using the table spectrometer "Maldi-Tof". As a result, it is mentioned that out of 120 exanimated samples at Maldi-Tof, 83 samples were confirmed with the presence of bacteria of the genus *Escherichia coli* (thermoresistant), and in the rest were detected bacteria such as: *Citrobacter brake, Acinetobacter baumanii, Morganella morganii, Proteus mirabillis, Klebsiella pneumonia, Klebsiela varriicola* and *Aeromonas verinii*. The prevalence of these bacteria in poultry carcasses demonstrates an increased risk to the health of poultry flocks and for consumers of poultry meat.

Cuvinte-cheie: Mediu de cultură, colonii microbiene, prevalență, carcase, păsări.

INTRODUCERE

Contaminarea cărnii cu microorganisme inclusiv cu cele patogene, care ajung în carne și organe în timpul vieții păsărilor, este condiționată de numeroși factori de mediu, alimentație, de nivelul măsurilor sanitare veterinare, de procesul tehnologic de creștere a păsărilor, precum și de procesul de sacrificare și de pregătire a carcaselor [1, 4].

Carcasele de pasăre pot fi contaminate mai des din surse externe, însă există riscuri și de contaminare internă. In funcție de condițiile fluxului tehnologic, a condițiilor igienice si de sănătate a personalului implicat în fluxul tehnologic de procesare a cărnii, poate avea loc contaminarea externă, situație cînd numărul de microorganisme poate ajunge la 102-103/cm2 suprafață carne/carcasă[3]. Pe carne pot ajunge microorganisme din genurile: *Pseudomonas*,

Bacillus, Clostridium, Micrococcus, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus etc., bacterii de putrefacție, microorganisme care se pot dezvolta pe carne chiar în condiții de refrigerare. Există posibilitatea sa persiste și o contaminare cu mucegaiuri, levuri a cârnii cauzate de aerul din unități, ca urmare a lipsei de igiena, a lipsei aerației corespunzătoare, a prezenței curenților de aer și a contaminării cu mucegaiuri a spatiilor[2, 5, 6].

La păsările de curte, contaminarea bacteriană la carcase apare mai des din cauze interne, datorata sistemului de creștere, condițiilor de transportare etc, fiind reprezentată de bacterii din genurile *Enterobacteriaceae,* inclusiv bacterii din genurile *Salmonella, Corynebacterium, Moraxella*. Aceste bacterii precum și multe altele se afla în cantități mari pe penaj și pe pielea păsărilor și care prezintă un efect negativ asupra proceselor ulterioare și asupra duratei de păstrare a calității cârnii. Unele bacterii condiționat patogene, cum ar fi *Lactobacillus* si ale genului *Brochothrix*, pot supraviețui și se dezvolta intens și în cazul păstrării cărnii prin vacuumare. Prin urmare, toate aceste forme bacteriene reprezintă riscuri pentru efectivele de păsări, dar și pentru sănătatea publică. Reieșind din cele menționate mai sus, scopul acestor investigații este de a stabili prevalența unor bacterii patogene care predomină in carnea de pasare și care reprezentă un risc pentru consumatorii cărnii de pasăre [2, 7, 8].

MATERIAL ȘI METODE

Probele pentru cercetare au fost prelevate din cadrul unui abator din mun. Chișinău. Materialul pentru cercetare a constituit pielea de la nivelul gatului. Au fost colectate două loturi de probe, primul lot constituind 27 de probe a câte 25 g, depozitate în pungi de polietilenă, iar lotul doi de probe a cuprins 5 locații de sacrificare diferite, unde respectiv s-a colectat pe subloturi, pentru sublotul 1- 4 probe , sublotul 2 - 6 probe, sublotul 3- 9 probe, sublotul 4 - 3 probe și sublotul 5 -1 probă. Colectarea probelor s-a efectuat cu respectarea normelor sanitare veterinare pentru a exclude contaminarea, inclusiv ce-a încrucișată.

Respectând normele de biosecuritate au fost pregătite mediile de cultură necesare. Pentru izolarea și identificarea formelor de bacterii din carcasele de pasăre au fost utilizate medii speciale produse de compania ”Oxoid”. Inițial procesul de îmbogățire și de incubare a probelor au fost incubate la termostat, cu regim de temperatură de 37^{O}C și 42^{O}C. Procesul de incubare este reprezentat pe figura 1 a) și b).



1. b)

Figură 1 a); b) *incubarea probelor în termostat la temperatura de 37^{o} C și 42^{o}C.*

mediile de cultură folosite în investigațiile microbiologice, precum și modul diluției, dar și destinația mediilor pentru izolarea tipurilor de bacterii, sunt prezentate în tabelul 1, unde se descriu mediile de îmbogățire, medii comune pentru identificarea mai multor genuri de bacterii.

Izolarea și tipizarea tipurilor de bacterii s-a efectuat în baza protocoalelor standardizate la nivel european, inclusiv și medii speciale pentru genurile de bacterii precum *Salmonella spp* si *Campylobacter spp.*

Inițial, pentru reactivarea bacteriilor la prima etapa, s-a folosit apa peptonată, probele fiind expuse în termostat la temperatura de 37^{o}C, timp de 24 de ore. Pentru identificarea bacteriile termofile, probele au fost menținute la termostat la temperatura de 42^{o}C, pentru 24 de ore.

Tabelul 1. Mediile de cultură folosite în investigațiile microbiologice

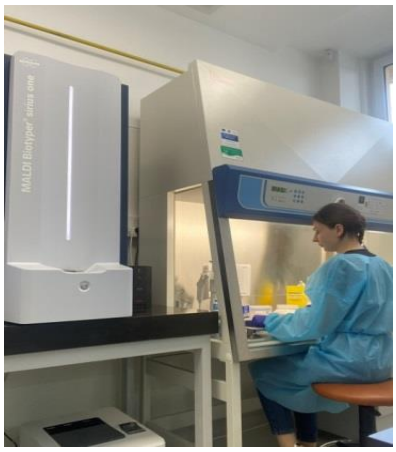
Mediile folosite:	Specificații
Apa peptonată	Toate bacteriile aerobe
MACCONKEY AGAR	Organisme coliforme, Salmonella, Shigella
LEVINE AGAR	E. coli, Enterobacterii aerogene, Lactoze pozitive si negative
AGAR COLUMBIA	Toate bacteriile aerobe
BUTZLER Campylobacter selective supplement	Campylobacter
KARMALI Campylobacter agar	Campylobacter

Ca medii speciale au fost folosite mediile de cultură: Levin si Macconkey, iar ca mediu secund s-a utilizat Agarul Columbia. Totodată, mediu Mueller-Hinton a fost utilizat pentru aprecierea activității antibacteriene a bacteriilor.

Din probele primului lot, însămânțările au fost efectuate pe 54 placi Pietri. În rezultat s-au identificat macroscopic 4 tulpini de bacterii, precum: *E. coli, Proteus,* bacterii cu lactoza pozitiva, bacterii cu lactoza negativa. Acestea au fost reînsamanțate pe mediu Agar-Columbia, fiecare proba având 8 cadrane pentru revizuirea tulpini prezente, acestea au fost împrospătate peste 48 h. Pe figurile 2 și 3 este prezentată metodica însămânțărilor pe mediile de cultură și pregătirea probelor din coloniile bacteriene pentru investigații prin tehnica MALDI-TOF.



Figură 2. *Însămânțarea mediilor de cultură*



Figură 3 *Tipizare bacteriană prin tehnica MALDI-TOF*

În cazul lotului 2, au fost efectuate însămânțări pe următoarele medii de cultură: 14 placi cu mediul Macconkey, 14 placi cu mediul Levin , 8 plăci Petri cu probe specifice ESBL, KPC, STEC. Coloniile bacteriilor obținute după identificare au fost depozitate la temperatura de 6-8^{o}C în eprubete Epindorf cu apa pieptonata 1.5ml.

Bacteriile obținute au fost identificate cu ajutorul spectrometriei de masa MALDI-TOF. Aceasta metoda consta în folosirea acidului formic pentru distrugerea peretelui celular care va expulza proteinele si facilita ionizarea acestora și matricei care are rolul de absorbție a luminii ultraviolete și convertirea ei în energie, evaporând-o împreuna cu proba (spectrometrie de masă cu timp de zbor).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din coloniile bacteriilor isolate din probele pentru cercetare, au fost încărcate peste 120 de godeuri pentru investigatii la Maldi-Tof. Rezultatele obținute din examinarea probelor primului

lot s-au soldat cu stabilirea următorului număr de isolate: 83 - Escherichia coli, 5 - Citrobacter braaki , 12 - Acinetobacter baumanii, 32 - Morganella morganii, 39 - Proteus mirabillis, 6 - Klebsiella pneumonia, 1- Klebsiela varriicola, 4- Aeromonas verinii.

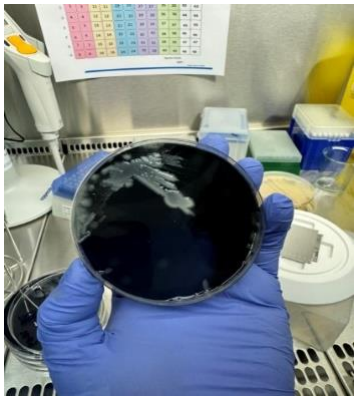
Tabelul 2. Resultatele obținute în investigațiile Maldi-Tof

Tipul bacteriilor izolate	Numărul probei
Escherichia coli	P2.1 , P8.7 , PA.1 (20 lac+), CP10 4, PA (24 lac+), DP4 1, P10.1, PA (22 lac+), P10.2, DP 4 3, Pb7.2, P8.4, P10.3, PA (2 col repet), DP4.5, P7.3, P8.5, PB1, DP4.7, P8.5, P10.2, PB2 , PC10, P10.1, PB3,
Citrobacter braaki	P7.6, P7.7
Acinetobacter baumannii	PB4, P2.4, PD4.2, P8.3
Morganella morganii	P2.2, P8.8, PD4.8, P7.5
Proteus mirabilis	P8 col M, P8.1, P7.1, PA 2 col, P1, P10.4, P7.4, P8.6 , PC10.3
Klebsiella pneumoniae	P10.3, PC10.1, PC10.2
Klebsiella variicola	PC10.2
Aeromonas veronii	PE1.6

Rezultatele obținute din examinarea probelor lotului 2 s-au soldat cu stabilirea următorului număr de isolate: 33 - E. coli, 4 -Aeromonas veronii, 3 - Aeromonas ichtiosmia, 1- Aeromonas jaadaei, 1- Aeromonas hydrophila, 4 -Pseudomonas thermotolerans, 1- Pseudomonas otitidis, 5 - Acinetobacter baumannii, 1- Klebsiela pneumoniea, 2 - Campylobacter jejuni, 1- Campylobacter coli.







Figură 4. Coloniile *Aeromonas jaadaei* **Figură 5.** Coloniile *Klebsiella pneumonia* **Figură 6.** *Campylobacter jejuni.*

Până la efectuarea investigațiilor prin tehnici de Maldi-Tof, coloniile bacteriilor isolate au fost examinate și descrisre după caracteristicile morfologice, luînd în calcul modul de creștere pe mediile de cultură, culoarea, forma coloniilor.

Pe figurile 4, 5 și 6 sunt prezentate unele caracteristici morfologice a modului de creștere a bacteriilor precum: cultura pură a bacteriilor din genurile Aeromonas jaadaei, Klebsiella pneumonia (pe mediul Columbia) și cultura de Campylobacter jejuni, isolate din probe de material cercetat.

CONCLUZII

1. Cercetările bacteriologice a carcaselor refrigerate de pasăre prin tehnicile de identificare Maldi -Tof au confirmat prezența unei flore asociate de bacterii, reprezentată în mare măsură de bacterii din familia Enterobacteriaceae, cu predominarea bacteriilor precum: *E. coli*, urmată de *Proteus mirabillis, Morganella morganii, Acinetobacter baumanii* și *Klebsiella pneumonia*.

2. Important de menționat faptul, că bacteriile E. coli care au reprezentat peste 60% din numărul izolatelor din carnea de pasăre refrigerată, au fost termofile, dezvoltînduse liber la temperatura de 42^{o}C, moment ce demonstrează o deosebire semnificativă în comparație cu alte forme de bacterii și care necesită cercetări suplimentare pentru stabilirea și a altor indici de patogenitate și rezistență.

BIBLIOGRAFIE

1. Ameer, S., Al-Esawi, A., Zeina, T., Al-Salami, A, Salah, M., Al-Jannah, A., Khawlah, A. Salman, B. Occurrence of Enterobacteriaceae in raw chicken meat samples with identification of Salmonella enterica subsp. Diarizonae as the first report in Iraq. Journal Research and Innovation in Food Science and Technology 2024; 13(1), p.23-26.

2. Amélie, R., , Odile, T., , Monique, Z. Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. Journal Microorganisms. 2017 Aug 25;5(3):50. doi: PMCID: PMC5620641 PMID: 28841156.

3. Karahmet, E., Isaković, S., Operta, S., Hamidović, S., Toroman, A., Đulančić, N., Muhamedagić, S. Microbiological contamination of fresh chicken meat in the retail stores. Journal Food and Nutrition Sciences. Vol.12 No.1, January 2021, doi: 10.4236/fns.2021.121006.

4. Keener K., Bashor M., Curtis P., Sheldon B., Kathariou S. Comprehensive review of Campylobacter and poultry processing. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2004;3:105–116. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x.

5. Principle of MALDI/TOFMS : Shimadzu (România).

6. *Risma, W. R., Hamdan, H., Yamin, Y., La Ode, S., Fitria, D., Rina, A., Denvy, M. D., Deki, Z.* Assessment of bacterial contamination in locally sourced chicken meat from markets Kendari city, Indonesia. Indonesia Journal of Animal Agricultural science.Vol 6, No 1. 2024. DOI: http://dx.doi.org/10.33772/ijaas.v6i1.47148.

7. Thames, H. T., et al. "The Prevalence of Salmonella and Campylobacter on broiler meat at different stages of commercial poultry processing." Journal Animals, vol. 12, no. 18, 17 Sept. 2022, p. 2460, https://doi.org/10.3390/ani12182460.

8. US Department of Agriculture, National Agriculture Statistics Service Campylobacter (Last Reviewed 7 August 2013) [(accessed on 7 May 2021)]; Available online: https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/campylobacter