https://doi.org/10.52326/ismv2024.17
CZU: 619:616.98:579.842.14:636.52/.58.034

INVESTIGAȚII MICROBIOLOGICE AI INCIDENȚEI BACTERIILOR SALMONELLA SPP. LA UNELE UNITĂȚI AVICOLE DE PRODUCERE A OUĂLOR

Nicolae STARCIUC, Olga JUNCU, Natalia OSADCI,
Valentina CREȚU, Cristina SÎRBU, Oxana GROZA
Universitatea Tehnică a Moldovei

Abstract. The purpose of the respective research was focused on establishing the incidence of *Salmonella spp.* bacteria in some poultry enterprises and the prevalence of *Salmonella* bacteria in the background of the microbiome present in laying hens units. The study was carried out on fecal samples taken from poultry units, as well as on samples taken from the dead laying birds at the same

period of examination. For isolation and identification of bacterial microbiome and *Salmonella* bacteria serotypes were used selective and differential culture media, including special media for *Salmonella* identification. The research was carried out at three stages of the egg production process as before the laying period, in the meddle and towards the end of the laying period.

The obtained results show that the index of *Salmonella spp*. bacteria in faces had relatively low variations before the laying period, such as (0.65±0.16 log UFC/g at the age of 145-165 days, with an insignificant increase in the middle of the laying period, reaching the index of 0.71±0.08 log UFC/g, with a doubling of the indices up to 1.66±0.24 log UFC/g ($p>0.05$) at the end of the laying period (450-470 days). In case when the samples were taken at the same studded periods from the dead laying hens, the index of bacteria of the genus *Salmonella* increased from 2.61±0.15 log UFC/g at the beginning of egg production (145-165 days) and increased considerably up to 3.38±0.26 log CFU/g at the end of the egg laying period (450-470 days). The obtained results demonstrate that towards the end of the laying period, the number of conditionally pathogenic bacteria increased and at the same time the number of bacteria from the genus *Salmonella* increases significantly, a fact that could also lead to the outbreak of bacterial diseases in poultry flocks, especially salmonellosis.

INTRODUCERE

Creșterea păsărilor de curte cu progresele tehnologice atinse la momentul actual au condus la generarea și extinderea acestui sector pe scară largă. La momentul actual studiile geonomice și metagenetice sunt cele mai inovatoare abordări în domeniul siguranței alimentare. Important este faptul ca în acest context să se ea în calcul și importanța bolilor infecțioase la păsări [2,10,14]. Aceste studii permit izolarea și descrierea detaliată a caracteristicelor diferitor agenți patogeni cu caracter zoonotic, cum ar fi: *Salmonella spp*. *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli etc,* la păsările de curte. Cercetările științifice de ordin genomic au relevat importanța microbiotei intestinale asupra sănătății, dar și în cazul de boală la păsări, precum și utilizarea lor pentru monitorizarea situației epidemiologice și oferirea dovezilor concrete despre rolul infecțiilor păsărilor de curte în infecțiile zoonotice umane [3,7,11].

Păsările de curte și produsele derivate ale păsărilor, cum ar fi carnea și ouăle, sunt printre principalele surse de transmitere a diferitor agenți infecțioși la om, precum și a bacteriilor din genul *Salmonella spp*. [8,13].

Prin urmare, agentul patogen al salmonelozei aviare este diseminat în mod obișnuit la păsările domestice și sălbatice, iar simptomele clinic ale infecției sunt caracterizate prin febră, diaree, mortalitate crescută la puii mici, scăderea producției de ouă, peritonite vitelinice la păsările ouătoare, etc. [1,5,13].

Printre germenii patogeni de importanță epidemică crescută la păsări se menționează *Salmonella spp.*, care și reprezintă una dintre cauzele cele mai frecvente în rândul toxiinfecțiilor alimentare la populația umană la nivel global. În special păsările reprezintă sursa primară al acestui agent patogen, însă produsele alimentare obținute de la păsările contaminate și purtătoare de germeni sunt principala cale de transmitere la om. În acest context, înțelegerea deosebirilor epidemiologice a germenilor patogeni din genul *Salmonella* joacă un rol important în controlul, monitorizarea și supravegherea eficientă a acestora de-a lungul lanțului alimentar cu accentul de bază pus pe controlul salmonelelor la efectivele de păsări vii [4,7,13,15].

Acest fapt, demonstrează importanța cercetărilor efectuate de către cercetătorii în identificarea prevalenței serotipelor de *Salmonella spp.* la păsările de curte, în produsele alimentare de origine animală și în probele de mediu, examinarea diversității și frecvenței serotipelor acestora, precum și evaluarea importanței serotipelor zoonotice precum *S. Typhimurium* și *S. Enteritidis*, ca o sursă primară potențială de agenți patogeni pentru sănătatea publică [6, 9,15].

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate la Departamentul Siguranța Alimentelor și Sănătate Publică al facultății de Medicină Veterinară a Universității Tehnice din Moldova, la Centrul Republican de

Diagnostic Veterinar (laboratorul încercări produse alimentare și în laboratorul de Diagnostic Sănătate Animală), precum și în laboratorul de microbiologie al Institutului Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară. Ca material pentru cercetare au servit probele de materii fecale prelevate de la unele unități avicole de producere a ouălor de consum curent din republică (probe cu mărimea de 150 g, prelevată din diferite regiuni ale încăperii avicole) , precum și probe prelevate de la cadavrele păsărilor ouătoare (din cecumuri și din oviduct). Prelevarea probelor s-a efectuat la trei perioade semnificative din perioada ciclului de producere a ouălor, precum ar fi: înaintea începerii perioadei de ouat (145-165 de zile), la mijlocul perioadei de ouat (290-310 de zile) și spre finele perioadei de ouat (450-470 de zile).

Pentru izolarea tipurilor de microorganisme, inclusiv bacteriile din genul *Salmonella spp.* au fost folosite medii de cultură cum ar fi: agarul și bulionul peptonat, mediul Endo, Saburo, Levin. Pentru izolarea și identificarea bacteriilor din genul *Salmonella spp.* au fost folosite mediile de cultură Bismut sulfit agar, Salmonella Sighella Agar, Brilliance Salmonella Agar (BSA), iar ca medii de imbogățire au fost folosite Apa peptonată tamponată (APT); Mediu Rappaport-Vassiliadis cu soia (bulion RVS); Bulion Muller-Kauffman tetrationat-novobiocina (bulion MKTTn); Agar xiloză-lizină-dezoxicolat (agar XLD).

Izolarea și identificarea bacteriilor din genul *Salmonella spp*. a fost efectuată conform metodei SM EN ISO 6579-1:2017 - Microbiologia lanțului alimentelor. Metoda orizontala pentru detectarea, numărarea si tipizarea serologica a bacteriilor de genul Salmonella".

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul respectiv a avut ca scop de a stabili care este componența și diversitatea florei bacteriene la efectivele de întreținere a găinilor ouătoare pentru producerea ouălor de consum curent. Pentru studiul respectiv, periodic, de la efectivele de păsări au fost prelevate probe de materii fecale conform standardelor în vigoare. O probă pentru cercetare era fost constituită din 150g materii fecale de la o hală, constituită din volumul prelevat din diferite părți ale încăperii. Concomitent de la cadavrele de găini ouătoare, în mod aleatoriu, sau prelevat materii fecale de la nivelul cecumurilor precum și de la nivelul oviductelor.

Rezultatele studiului cu referire la incidenta diferitor tulpini de bacterii din combinația microbismului materiilor fecale din halele pentru întreținerea găinilor ouătoare sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Componența microbiologică a materiilor fecale prelevate de la găinile ouătoare (n=5), log UFC/g

Tipul bacteriilor	Termenii de prelevare a probelor pe perioada ouatului (zile)		
	145-165 (începutul ouatului)	**290-310 (mijlocul perioadei ouatului)**	**450-470 (finalul perioadei ouatului)**
Salmonella spp.	**0,65±0,16**	**0,71±0,08**	**1,66±0,24***
E.coli (bact. coliforme)	**8,85±0,29**	**8,37±0,74**	**8,79±0,61**
Mycoplasma	**0,68±0,21**	**0,68±0,13**	**1,45±0,18***
Streptococi	**2,52±0,09**	**2,16±0,22**	**3,14±0,20***
Stafilococi	**1,15±0,37**	**1,22±0,25**	**2,57±0,24***
Proteus	**0,70±0,09**	**0,57±0,11**	**3,06±0,20****
Fungi	**0,69±0,25**	**0,37±0,11**	**3,18±0,22****

* B= 0,95 (p>0,05); ** B=0,99 (p>0,01); *** B=0,990 (p>0,001)

Rezultatele obținute relatează că la găinile ouătoare, indicele bacteriilor coliforme în perioada începutului ouatului (145-165 zile) a constituit 8,85±0,29 log UFC/g, cu variații practic constante de 8,37±0,74 log UFC/g la mijlocul perioadei ouatului (290-310 zile) și 8,79±0,61 log UFC/g la finele perioadei ouatului (290-310 zile).

De menționat faptul că indicele bacteriilor din genul *Salmonella spp.* a avut variații relativ reduse, precum (0,65±0,16 log UFC/g la vârsta de 145-165 de zile cu o creștere dublă de 1,66±0,24 log UFC/g (p>0,05), la finele perioadei ouatului (450-470 de zile. Ca indice mărit al formelor de bacterii l-a constituit *Streptococii,* care au avut valori de 2,52±0,09 log UFC/g la vârsta păsărilor de 145-165 de zile, cu o majorare de până la 3,14±0,20 log UFC/g (p>0,05), la finele perioadei de ouat 450-470 de zile. Indicele *Stafilococilor* a variat de la 1,15±0,37 log UFC/g la începutul perioadei ouatului având o creștere de până la 2,57±0,24 log UFC/g (p>0,05), la finele perioadei de ouat (450-470 de zile). Bacteriile din genul *Proteus* la începutul perioadei de ouat a avut variații de 0,70±0,09 log UFC/g cu o creștere semnificativă la finele perioadei de ouat de până la trei ori , având valori de până la 3,06±0,20 log UFC/g (p>0,001) la finele perioadei de ouat (450-470 de zile). Considerabil a crescut și numărul de fungi, care au variat de la 0,69±0,25 log UFC/g la începutul perioadei ouatului până la 3,18±0,22 log UFC/g (p>0,01) la finele perioadei de ouat. Referitor la bacteriile din genul *Mycoplasma* se menționează că la începutul perioadei ouatului a avut valori de 0,68±0,21 log UFC/g, iar la finele perioadei ouatului acest indice s-a dublat, constituind 1,45±0,18 log UFC/g (p>0,05).

Datele obținute permit de a relata că pe parcursul perioadei de ouat, se majorează semnificativ toți indicii bacteriologici, unii fiind dublați sau chiar triplați, fapt ce denotă că concomitent se măresc și riscurile de apariție e unor boli contagioase, pe fonul cărora este prezent și riscul declanșării salmonelozei aviare.

Concomitent cu cercetările bacteriologice efectuate la găinile ouătoare au fost cercetate și incidența peritonitelor vitelinice la cadavrele găinilor ouătoare.

După necropsia cadavrelor, o atenție deosebită s-a atras la starea organelor de reproducție și în special la ovare, oviduct și respectiv prezența sau lisa peritonitelor vitelinice, leziune patomorfologică ”patognomică”, care este practic frecventă la majoritatea numărului păsărilor contaminate cu bacterii din genul *Salmonella spp.* Pe figurile 1 și 2 sunt prezentate imaginile care reprezintă găinile ouătoare cu modificări tipice de peritonită vitelinică.

Pe figura 1 sunt reprezentate modificările patomorfologice la cadavrele găinilor ouătoare, care reprezintă mase coagulare de ovule sparte în cavitatea abdominală, precum și o mulțime de ovule afectate, de culoare cafeniu-închisă, acumulare de amestec exsudat-țesut cu adaos de fibrină, iar pe figura 2 sunt reprezentate masele de amestec exsudat cu conținut al ovulelor sparte, cu prezența de conținut al ovulelor printre intestine si în cavitatea abdominală.

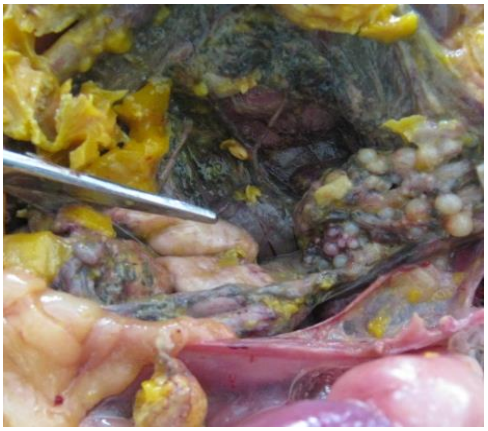


Figura 1. *Peritonită vetelinică la cadavrul de găina ouătoare (peritonită vitelinică, cu ovule deformate și de culoare bruna- cenușie).*



Figura 2. *Peritonită vetelinică la cadavrul de gainâ ouătoare (peritonită vetelinică, ovule sparte și conținut de ovule printre intestine).*

Pentru a stabili incidența bacteriilor din genul *Salmonella spp.* pe fonul altor bacterii la cadavrele găinilor ouătoare, de la cadavrele necropsiate au fost prelevate probe de material patologic pentru a stabili predominanța florei bacteriene, precum și nivelul de incidență a

bacteriilor din genul *Salmonella spp.* Prelevarea probelor a coincis cu perioada de colectare a probelor pentru cercetare de la efectivul de găini ouătoare (la perioada începutului ouatului 145-165 zile; mijlocul perioadei ouatului 290-310 zile și spre finalul perioadei ouatului 450-470 zile). Probele pentru cercetare au fost constituite din conținutul intestinal, conținutul peritoneal și al oviductelor. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabelul 2. Analizând datele din tabel se poate de menționat că fonul microbian este reprezentat de o asociere diversă de microorganisme coliforme, strepto si stafilococică, dar di de bacterii din genurile Proteus și fungi microscopici.

Tabelul 2. Componența microbiologică a materialului pentru cercetare prelevat de la cadavrele găinilor ouătoare (n=5), (n=5), log UFC/g

Tipul bacteriilor	Termenii de prelevare a probelor pe perioada ouatului (zile)		
	145-165 (începutul ouatului)	290-310 (mijlocul perioadei ouatului)	450-470 (finalul perioadei ouatului)
Salmonella spp.	**2,61±0,15**	**2,77±0,08**	**3,38±0,26**
E.coli (bact. coliforme)	**10,43±0,12**	**9,43±0,68**	**10,27±0,21**
Mycoplasma	**2,04±0,20**	**2,65±0,11**	**2,77±0,24**
Streptococi	**3,33±0,25**	**3,14±0,33**	**3,84±0,19**
Stafilococi	**2,30±0,30**	**2,05±0,42**	**3,84±0,12****
Proteus	**2,08±0,28**	**2,25±0,11**	**3,93±0,41***
Fungi	**2,02±0,25**	**1,73±0,20**	**3,88±0,17****

* B= 0,95 (p>0,05); ** B=0,99 (p>0,01);

La cadavrele găinilor ouătoare, indicii microflorei intestinale și de la nivelul oviductelor au demonstrat indici semnificativi măriți ai bacteriilor de toate genurile.

În perioadele menționate, indicele bacteriilor coliforme la cadavrele găinilor a variat de la 10,43±0,12 log UFC/g la începutul perioadei ouatului (145-165 de zile), oscilând cu variații de 10,27±0,21 log UFC/g, la cadavrele găinilor cu vârsta de 450-470 (finalul perioadei ouatului). În același timp, indicele bacteriilor din genul *Salmonella,* a crescut de la 2,61±0,15 log UFC/g la cadavrele găinilor ouătoare (începutul ouatului 145-165 de zile) și până la 3,38±0,26 log UFC/g la cadavrele găinilor cu vârsta de 450-470 de zile. Indicele bacteriilor din genul *Streprococcus* a avut variații de la 3,33±0,25 log UFC/g la cadavrele găinilor cu vârsta de 145-165 de zile atingând valori de până la 3,84±0,19 log UFC/g la cadavrele găinilor spre finele perioadei de ouat (450-470 de zile). Indicii valorici ai bacteriilor din genul *Stafilococus* au avut variații de la 2,30±0,30 log UFC/g la începutul perioadei de ouat, atingând valori de 3,84±0,12 log UFC/g (p>0,01), la cadavrele găinilor ouătoare spre finele perioadei de ouat. Relativ înalți au fost și indicii fungilor cu variații 2,02±0,25 log UFC/g la începutul perioadei ouatului cu o creștere semnificativă, până la 3,88±0,17 log UFC/g (p>0,01), la cadavrele de găini la finele perioadei de ouat. La finele perioadei de ouat, variații înalte au avut și indicii bacteriilor precum *Proteus* și *Mycoplasma*, având indicii de până la 3,93±0,41 log UFC/g (p>0,05) și 2,77±0,24 log UFC/g, respectiv.

Rezultatele obținute demonstrează că spre sfârșitul perioade de ouat, numărul bacteriilor condiționat patogene crește și totodată semnificativ crește și numărul bacteriilor din genul *Salmonella*, fapt care ar putea duce și la declanșarea unor boli bacteriene la efectivele de păsări, dar mai cu seamă a salmonelozei.

CONCLUZII

1. Rezultatele obținute permit de a relata că îndeplinirea măsurilor sanitare veterinare și curativ profilactice în cadrul întreprinderilor avicole, nu diminuează pe deplin riscurile de contaminare cu bacterii din genul *Salmonella spp.* , persistând în continuare o problemă importantă pentru sănătatea efectivelor de păsări, precum și riscuri majore pentru sănătatea publică.

Cercetările bacteriologice efectuate au demonstrat, că componența microflorei condiționat patogenă cu cel mai înalt indice a fost reprezentată de bacterii din genul E. coli (bacterii coliforme, constituind 10,27±0,21 log UFC/g) la cadavrele găinilor cu vârsta de 450-470 de zile, la care în același timp și bacteriile din genul *Salmonella spp.* au avut indici majorați, reprezentând valori de 3,38±0,26 log UFC/g, fapt ce denotă riscuri crescute pentru efectivele de păsări și pentru produsele avicole.

BIBLIOGRAFIE

1. Ahmed, A.O., Raji, M.A., Mamman, P.H., et all. Salmonellosis: Serotypes, prevalence and multi-drug resistant profiles of Salmonella enterica in selected poultry farms, Kwara State, North Central Nigeria. In: *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 2019; 86(1):a1667. PMID: 31170784, PMCID: PMC6556926. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31170784/

2. Ansari-Lari, M., Hosseinzadeh, S., Manzari, M., et all. Survey of Salmonella in commercial broiler farms in Shiraz, southern Iran. In: *Prev Vet Med*. 2022 Jan;198:105550. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105550. Epub 2021 Nov 26.PMID: 34864328

3. Bahramianfard, H., Derakhshandeh, A., Naziri, Z., et all. Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of Salmonella Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. In: *BMC Veterinary Research* journal. 2021, page 196. PMID: 34030671, PMCID: PMC8142639. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34030671/

4. Buddhasiri, S., Sukjoi, C., Tantibhadrasapa, A., et all. Clinical Characteristics, Antimicrobial Resistance, Virulence Genes and Multi-Locus Sequence Typing of Non-Typhoidal *Salmonella* Serovar Typhimurium and Enteritidis Strains Isolated from Patients in Chiang Mai, Thailand. In: *Microorganisms journal.* 2023; 11(10):2425. doi: 10.3390/microorganisms11102425.

PMID:37894083. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37894083/

5. Deblais, L., Kathayat, D., Helmy, Y.A., et. all. Translating 'big data': better understanding of host-pathogen interactions to control bacterial foodborne pathogens in poultry. In: *Animal Health Research Reviews*, 2020, pages 15-35, PMID: 31907101 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31907101/

6. Diaz, D., Hernandez-Carreño, P.E., Velazquez, D.Z., et all. Prevalence, main serovars and anti-microbial resistance profiles of non-typhoidal Salmonella in poultry samples from the Americas: A systematic review and meta-analysis. In: *Transbound Emerg Dis.* 2022; 69(5):2544-2558. doi: 10.1111/tbed.14362. PMID:34724337. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34724337/

7. Ferrari, R.G., Rosario, D.K.A., Cunha-Neto, A., et all. Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. In: *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 2019; 85(14):e00591-19. doi: 10.1128/AEM.00591-19. PMID: 31053586. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31053586/

8. Firouzabadi, A., Saadati, D., Najimi, M., et all. Prevalence and related factors of Salmonella spp. and Salmonella Typhimurium contamination among broiler farms in Kerman province, Iran. In: *Prev Vet Med.* 2020 Feb;175:104838. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104838. Epub 2019 Nov 14. PMID:31812008

9. Hamed, E.A., Abdelaty, M.F., Sorour, H.K., et al. Monitoring of Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Poultry Farms from 2014 to 2018. *In: Veterinary Medicine International journal*. 2021; Article ID 6739220, 8 pages. doi: 10.1155/2021/6739220

10. Isoken, H. I., Chukwunonso, N. A., Abeni, B., et. all. Identification and characterization of MDR virulent Salmonella spp isolated from smallholder poultry production environment in Edo and Delta States, Nigeria. In: *PLOS ONE journal*. 2023. PMID: 36735693, PMCID: PMC9897568. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36735693/

11. Lai, J., Mu, H., Zhou, B., et all. *Bla*$_{\text{TEM}}$-positive *Salmonella enterica* serovars Agona and Derby are prevalent among food-producing animals in Chongqing, China. In: *Front Microbiology journal,* 2023; 14:1011719. doi: 10.3389/fmicb.2023.1011719. PMID: 37303807. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37303807/

12. Lozano-Villegas, K.J., Herrera-Sánchez, M.P., Beltrán-Martínez, M.A., et all. Molecular Detection of Virulence Factors in Salmonella serovars Isolated from Poultry and Human Samples. In: *Veterinary Medicine International journal*. 2023;1875253. doi: 10.1155/2023/1875253. eCollection 2023.PMID: 36910894. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36910894/

13. Obe, T., Nannapaneni, R., Schilling, W., et all. Antimicrobial tolerance, biofilm formation, and molecular characterization of Salmonella isolates from poultry processing equipment. In: *Journal of Applied Poultry Research*. 2021; 30:100195.

14. Wajid, M., Awan, A.B., Saleemi, M.K., et all. Multiple Drug Resistance and Virulence Profiling of Salmonella enterica Serovars Typhimurium and Enteritidis from Poultry Farms of Faisalabad, Pakistan. In: M*icrobial Drug Resistance journal.* 2019, pages 133-142. PMID: 30113248. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30113248/

15. Waktole H, Ayele Y, Ayalkibet Y,Prevalence, Molecular Detection, and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolates from Poultry Farms across Central Ethiopia: A Cross-Sectional Study in Urban and Peri-Urban Areas. In: *Microorganisms journal.* 2024 Apr 10;12(4):767. doi: 10.3390/microorganisms12040767.PMID: 38674711