

REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

“CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND MONITORIZAREA ȘI CONTROLUL UNOR TIPURI DE *SALMONELLA* ÎN FERMELE DE BROILER ȘI GĂINI OUĂTOARE ÎN ROMÂNIA”

Doctorand: NEGHIRLĂ Ioana Alexandra

Conducător științific: Prof.univ.dr. PREDOI Gabriel

Cuvinte cheie: *Salmonella*, serovariante, găini ouătoare, broileri

Teza de doctorat, cu un număr total de 224 pagini, împărțite în 12 capitole, este structurată, conform cerințelor în vigoare, în două părți: “*Studiu bibliografic*”, cu un număr total de 54 pagini și “*Cercetări personale*”, care se întinde pe un număr de 170 pagini. Lucrarea prezintă un total de 37 tabele și 156 imagini, majoritatea dintre ele fiind inserate în partea personală (28 tabele și 138 fotografii).

PARTEA I “STUDIUL BIBLIOGRAFIC” cuprinde 6 capitole, în care sunt prezentate principalele aspecte bibliografice despre salmoneloză, referitoare la etiologie, surse și căi de infecție, patogenitatea salmonelozelor animale, simptomatologie și tablou lezional. Sunt precizate date privind tehnicile de diagnostic, cu accent pe metodele clasice și moderne de laborator, utilizate în cadrul controlului oficial. Ultimul capitol al primei părți prezintă succint, informații privind dinamica epidemiologică la om și animale, atât în context internațional, dar și evoluția la nivel național. Toate aceste informații au la bază consultarea a 120 titluri bibliografice, dintre care 2 articole ale doctorandei, cu date preliminare obținute în cadrul cercetărilor efectuate.

CAPITOLUL I, intitulat “**Date privind bacteriile din familia *Enterobacteriaceae*”** prezintă date cu caracter istoric, aspecte referitoare la morfobiologia bacteriilor încadrate în familia enterobacteriaceae, precum și date actuale privind morfobiologia, cultivarea și proprietățile biochimice ale bacteriilor încadrate în genul *Salmonella*.

CAPITOLUL II “Etiologia și taxonomia salmonelelor” prezintă o serie de referințe cu privire la taxonomia bacteriilor din genul *Salmonella*. Practic, Organizația Mondială a Sănătății (WHO) în colaborare cu Centrul de Referință și Cercetare privind Salmonella (Institutul Pasteur, Paris), propune ca genul *Salmonella* să fie împărțit în două specii: *S. enterica* și *S. bongori* (fostele subspecii V). Salmonelozele sunt produse de membrii genul *Salmonella* care în conformitate cu ultima nomenclatură cuprinde două specii și anume *Salmonella enterica* și *Salmonella bongori*. După anii 2000, a fost propusă o a 3-a presumptivă specie și anume *Salmonella subterranea*, în baza izolării din mediul înconjurător a unei singure și neobișnuite tulpini. *Salmonella enterica* este împărțită în 6 subspecii care se diferențiază prin anumite caracteristici biochimice: Subspecia I = *Subspecies enterica*: 1.531 serovariante; Subspecia II =

Subspecia *salamae* 505 serovariante; Subspecia IIIa = Subspecia *arizonae* 99 serovariante; Subspecia IIIb = Subspecia *diarizonae* 336 serovariante; Subspecia IV = Subspecia *houtenae* 73 serovariante; Subspecia V = Subspecia *indica* 13 serovariante. *Salmonella bongori* cuprinde mai puțin de 22 serovariante, cu mențiunea că acestea sunt extrem de rare. Tulpinile de *Salmonella* sunt clasificate în serovariante pe baza mării diversități a antigenelor lipopolizaharidice (LPS) "O" și a antigenelor proteice flagelare "H" în acord cu schema Kauffmann-White care se actualizează constant.

Sunt precizate, de asemenea, aspecte referitoare la structura antigenică, serotipizarea, fagotiparea sau biotiparea, precum și patogenitatea salmonelelor.

CAPITOLUL III "Surse, căi de infecție și patogeneza salmonelozelor animale" tratează rezervoarele principale, circuitul salmonelelor în natura și patogeneza. Toate serovariantele de *Salmonella* pot fi patogene dar principala condiție este ca doza infectantă de salmonele viabile să fie semnificativ de mare (10⁷-10⁹ germeni), puterea invazivă (virulența) a tulpinii salmoneleice ingerate fiind o altă condiție pentru declanșarea infecției.

CAPITOLUL IV "Aspecte clinice și morfopatologice ale salmonelozelor" prezintă, succinct, aspecte referitoare la simptomatologia și tabloul anatomopatologic al salmonelozelor la păsări, mamifere și om.

CAPITOLUL V "Investigații de laborator" tratează principalele investigații specifice de laborator folosite în diagnosticul salmonelozelor, făcându-se referire mai ales la metodele folosite în cadrul controlului oficial al bolii: investigațiile bacteriologice, izolarea și identificarea salmonelelor, serotipizarea, identificarea genomului prin tehnici de biologie moleculară. Diagnosticul de laborator rămâne demersul major pentru identificarea prezenței agentului zoonotic *Salmonella*.

CAPITOLUL VI "Dinamica epidemiologică" menționează evoluția infecțiilor salmoneleice (salmoneleze) la om și animale, atât la nivel internațional, cât și pe plan național.

Incidența reală a salmonelozelor la om este dificil de evaluat, deoarece foarte multe țări nu au un sistem de supraveghere epidemiologică și chiar dacă există unul, cazurile sporadice de obicei nu sunt semnalate. În țările unde declararea este obligatorie, s-a observat faptul că numărul cazurilor a crescut considerabil în ultimii ani, dar aceasta observație este și ea parțial reală, datorită unei îmbunătățiri în declararea cazurilor. În 2016, cele 28 state membre UE au raportat 96.039 cazuri de salmoneloză la om, din care 94.530 cazuri au fost confirmate, rezultând o rată de notificare a UE de 20,4 cazuri la 100.000. În perioada 2014-2016 serotipurile implicate în cazurile detectate la om au drept origine cauze alimentare (ouă și produse din ouă, carne de pui și produse din aceasta), așa cum au fost raportate în baza de date EFSA. La nivelul UE, statele membre sunt obligate să implementeze programe de supraveghere pentru *Salmonella*, în conformitate cu legislația comunitară (Regulamentul (CE) Nr. 2160/2003), serotipurile țintă pentru supraveghere fiind *S. Enteritidis* și *S. Typhimurium*, inclusiv varianta monofazică.

Prevalența *Salmonella* variază de la o țară la alta, în funcție de tipul de producție al efectivului de păsări, dar și de metodele de detecție utilizate în laborator. Astfel, s-a observat că ouăle și

carnea de pasăre reprezintă sursa cea mai importantă pentru infecția umană, *S. Enteritidis* și *S. Typhimurium* fiind serotipurile cel mai frecvent raportate.

PARTEA A II-a “CERCETĂRI PERSONALE”, cuprinde 6 mari capitole, fiecare cu mai multe subcapitole, respectiv scopul lucrării, un capitol dedicat materialului și metodelor utilizate pe durata cercetărilor, apoi sunt prezentate aspecte generale și specifice privind programele naționale de control ale salmonelozelor zoonotice, rezultatele interpretate ale investigațiilor, măsurile sanitare veterinare aplicate în cazul identificării unui rezultat pozitiv pentru *Salmonella* Typhimurium și Enteritidis, la efectivele de pui carne și găini ouătoare, prevalența serovariantelor de *Salmonella* în România, în perioada 2013-2016, precum și partea finală a concluziilor și câteva recomandări.

Scopul lucrării este acela de a realiza investigarea prevalenței serotipurilor de *Salmonella* circulante la diferite specii de animale din România cu scopul de a determina prevalența serovariantelor de *Salmonella* care circulă la diferite specii de animale din România, precum și de a realiza o distribuție spațială de izolate de *Salmonella* la nivel județean, între anii 2013 și 2016.

Au fost evaluate leziunile morfopatologice, realizându-se corelații cu cele histopatologice și urmărindu-se modul în care tropismul celular al prezenței injuriei bacteriene influențează tabloul morfopatologic global. A fost realizată o diagramă flux privind diagnosticul bolii, atât cu metode bacteriologice clasice, cât și cu instrumentele moderne ale detecției de genom bacterian, în condițiile în care exigențele actuale ale controlului oficial impun acreditarea în conformitate cu standardele internaționale în vigoare. Au fost studiate aspectele ultrastructurale ale structurii flagelului de *S. Enteritidis*, comparativ cu protostructurile flagelare cu aspect elicoidal ale lui *S. Typhimurium*, aspect important de evidențiat, mai ales în cazul studiilor efectuate în obținerea vaccinurilor obținute din tulpini mobile.

CAPITOLUL VII “Material si metode” prezintă tipurile de probe / matrice de încercare luate în lucru, precum și metodele de investigare anatomoclinică și de laborator pentru aceste probe prelevate. Investigațiile au fost realizate în cadrul Laboratorului Național de Referință pentru Salmoneloze Animale coordonat de Serviciul de Bacteriologie, Serviciul de Morfopatologie, Serviciul de Biologie Moleculară din Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală București, în conformitate cu capabilitatea pentru metodele de diagnostic în cadrul controlului oficial.

Au fost efectuate investigații bacteriologice la un număr total de 1229 probe, din care 967 de la găini ouătoare și 262 pui de carne, astfel: 409 cadavre provenite de la găini ouătoare (339) și pui broileri (70 cazuri), 756 probe de fecale provenite de la cele două categorii (564 de la găini ouătoare și 192 de la pui de carne) și 64 probe compuse (cecumuri +oviducte) de la găini ouătoare.

Examenele necropsice care au permis evidențierea leziunilor morfopatologice s-au efectuat pe un număr de 824 cadavre (627 de la găini ouătoare și 197 de la pui de carne). Au fost aplicate o serie de metode de colorare specifice histopatologiei (HE, HEA, Martius Scarlet Blue, Brown și Brenn) pe secțiuni de țesuturi/organe, supuse tehnicii de microtomie și de includere în

parafină provenite de la 409 probe (339 cadavre de găini ouătoare și 70 pui de carne). De asemenea, au fost utilizate teste de biologie moleculară pe un număr de 44 izolate de la găinile ouătoare diagnosticate cu *Salmonella*, dar și investigații electronomicroscopice pe un număr de 13 izolate de la găini ouătoare cu *Salmonella*.

CAPITOLUL VIII “Aspecte generale și specifice privind programele naționale de control ale salmonelozelor zoonotice” pune în pagină informații referitoare la legislația europeană și națională aplicabilă în acest domeniu, Programele Naționale de Control al Salmonelozelor zoonotice pentru diferite categorii de păsări aprobate de UE pentru România prin Decizii Grant, precum și modalitatea de cofinanțare ale acestora, aspecte referitoare la modul de prelevare, ambalare, etichetare și transport al probelor la laborator, precum și obiectele principale ale programelor naționale de control al salmonelozelor zoonotice la efectivele de pui carne și găini ouătoare.

CAPITOLUL IX “Rezultate și discuții obținute în urma aplicării metodelor de laborator pentru evidențierea agenților zoonotici din genul *Salmonella*” sunt prezentate într-o manieră detaliată rezultatele investigațiilor efectuate pe probele luate în studiu.

A fost aplicată o diagramă flux pentru izolarea și identificarea salmonellei, în urma cărora au fost observate caracterele culturale, biochimice și morfotinctoriale specifice mai multor tulpini din genul *Salmonella* diagnosticate, atât la găini ouătoare, cât și la broileri. Identificarea serologică a constat în stabilirea structurii antigenice somatice cu ajutorul serurilor anti-*Salmonella* mono- și polivalente iar clasificarea în serovariante a tulpinilor de *Salmonella* a fost realizată conform standardului ISO/TR 6579-3:2014 ”Microbiologia produselor alimentare - Metoda orizontală pentru detecția, numărarea și serotipizarea *Salmonella* - Partea a 3-a Ghid pentru serotipizarea *Salmonella* spp” și în acord cu schema Kauffmann-White-Le Minor pe baza identificării antigenelor lipopolizaharidice “O”, a antigenelor proteice flagelare “H” și a antigenelor de înveliș “Vi”. Detecția genomului specific diferitelor serovariante de *Salmonella* s-a realizat utilizând 2 teste: testul multiplex PCR și testul de secvențiere, pe un număr de 44 de izolate de la găinile ouătoare diagnosticate cu *Salmonella*, tulpini care inițial au fost identificate fenotipic pe baza caracterelor culturale, morfotinctoriale, biochimice și tipizate serologic prin tehnici specifice de bacteriologie. Din analiza rezultatelor obținute în urma electronomicroscopiei pe care le-am obținut a reieșit că, în structura flagelului de *S. Enteridis*, rețelele de protoflagelină prezintă un aspect alungit, paralel și filamentos, comparativ cu protostructurile flagelare cu aspect elicoidal ale lui *S. Typhimurium*. Adevărata imagine a rezultatului prezenței injuriei bacteriene în țesuturi și organe a fost evidențiată de tehnicile histopatologice clasice, la toate cazurile examinate fiind observată o incidență și frecvență crescută a inflamațiilor proliferative de tip limfoid și/sau macrofagic, având o exprimare topohistopatologică în focare și/sau difuză, mai frecvent identificată la cazurile la care au evoluat infecțiile cu *S. Gallinarum* și *S. Enteritidis* comparativ cu infecțiile produse de *S. Pullorum*, la care leziunea constant identificată o constituie miocardita limfohistiocitară, forma difuză.

CAPITOLUL X “Măsuri sanitare veterinare aplicate în cazul identificării unui rezultat pozitiv pentru *Salmonella* Typhimurium și Enteritidis, la efectivele de pui carne și găini ouătoare” precizează aspecte extrem de importante referitoare la declararea unui efectiv

pozitiv cu *Salmonella*, precum și măsurile restrictive cu privire la efectivul (efectivele) în cauză, separat pe cele două mari categorii luate în studiu: găini ouătoare și broileri.

CAPITOLUL XI “Prevalența serovariantelor de *Salmonella* în România, în perioada 2013-2016” prezintă investigarea prevalenței serotipurilor de *Salmonella* care circulă la diferite specii de animale din România, precum și realizarea unei distribuții spațiale a izolatelor de *Salmonella* la nivel județean, în perioada menționată, 2013 -2016. Datele generate din colectarea informațiilor privind cele 5067 probe din perioada analizată, au fost introduse într-un Software Microsoft Excel 2007. A fost determinată, astfel, frecvența fiecărui serotip de *Salmonella* izolat, din diferite matrici și județ. În cadrul activităților oficiale privind programele de control a serotipurilor de *Salmonella*, respectiv realizarea programelor de monitorizare și control al salmonelozelor la animale, au fost analizate pentru tipizare un număr de 1323 probe în anul 2013, un număr de 1199 în 2014, în 2015 au fost analizate un număr de 1357 eșantioane, iar în anul 2016, un număr de 1188 probe. În perioada 2013-2016, studiul a fost realizat pe probe care au provenit de la 20 specii de animale domestice și sălbatice, situate pe tot teritoriul țării, din ferme, gospodării ale populației sau grădini zoologice

CAPITOLUL XII “Concluzii” stabilește 34 de concluzii bine argumentate extrase de pe parcursul cercetărilor efectuate și două recomandări.