

REZUMAT

Infecțiile salmonelice sunt frecvent întâlnite la păsări și mamifere, deoarece agenții patogeni (salmonelele) sunt larg răspândite în natură. Toate serotipurile (speciile) de salmonelle sunt parazite pentru animale și om. Astfel, germenii au fost izolați de la insecte, reptile, păsări, mamifere și de la om, ca și din diferitele elemente ale mediului ambiant (sol, ape de suprafață, alimente, furaje, etc.). Mai mult în ultimii ani asistăm la o activitate febrilă, la un adevărat asalt de comunicări, care semnaleză tot mai frecvent izolarea și identificarea unor serotipuri de *Salmonella*.

Multe din acestea sunt izolate din alimente și furaje, din natură sau din conținutul intestinal al animalelor și omului, fără să fie implicate în procese morbide, exprimate clinic și imunologic. Prezența lor în organism se exprimă doar prin stări de epifitism, respectiv prin stări de purtători și eliminatori de germeni, mai mult sau mai puțin îndelungate. Problema devine și mai sensibilă discuțiilor, în cazul așa ziselor tipuri „rare” de *Salmonella*, izolate mai ales de la animale și din furaje de origine animală. Din această cauză, pare normal să ne punem întrebarea, dacă sunt sau nu patogene aceste serotipuri (specii) și care trebuie să fie conduita noastră în contextul măsurilor de prevenire și combatere. Prezența salmonelilor într-un organism este legată fie de starea de portaj, fie de cea de boală. Mai mult, prezența unei salmonelle constituie un potențial factor patogenic atât pentru animale, cât și pentru om. Astfel, se admite că *Salmonella gallinarum* și *Salmonella pullorum* sunt agenți specifici pentru găină și alte specii de păsări, la care produc obișnuit infecții enzootice, caracterizate prin mari pierderi economice. Potențialitatea patogenă a acestora, deși prezintă o pronunțată adaptare la organismul speciei găină, se manifestă în anumite condiții și față de alte specii animale, inclusiv pentru om.

Pe de altă parte, multe din serotipurile (speciile) de *Salmonella* izolate inițial din alimente, furaje, animale, etc., pentru care nu există antecedente privind patogenitatea, s-au dovedit ulterior ca fiind un potențial patogen pentru animale, sau toxiinfecțios pentru

om. De asemenea, multe cercetări au urmărit să clarifice natura relațiilor ce se stabilesc între diferitele serotipuri (specii) de *Salmonella* și organismele în care acestea au pătruns.

Pare greu de explicat de ce, destul de frecvent, chiar și în cazul unor serotipuri foarte patogene, raporturile dintre organism și germeni rămân în stadiul de strict epifitism, mai mult sau mai puțin îndelungat.

Aceste aspecte au făcut să se considere că, serotipurile de *Salmonella* față de care organismul nu formează anticorpi, sunt lipsite de patogenitate pentru specia animală respectivă, deoarece nu generează de fapt, o stare de conflict. Totuși, între starea de conflict și patogenitatea unui tip de *Salmonella*, pentru o anumită specie animală, există relații de interdependență.

Mai mult, sunt semnalate stări de purtători interstinali la porcine cu *Salmonella cholerae-suis* (Bugeac și col.) și la bovine cu *Salmonella enteritidis*, fără ca în serul sanguin să se depisteze anticorpi specifici.

Din numeroasele investigații bacteriologice, rezultă că natura relațiilor ce se stabilesc între organism și germeni, este adeseori deosebit de complexă. Ele se manifestă uneori numai prin stări de epifitism intestinal, germenii nedepășind bariera gastro-intestinală.

Alteori, se constată o penetrație limitată a salmonelelor exprimată prin localizări în limfonodurile mezenterice, etc., fără să fie însoțită de manifestări morbide sau activări imunologice. Aceste stări de echilibru dinamic se pot transforma în procese infecțioase, uneori deosebit de grave, cu evoluție septicemică, sub acțiunea unor factori stresanți.

De aceea, stările de epifitism sau stările de purtători cu localizări organice, trebuie privite de fapt ca forme particulare de manifestare ale aceluiași proces infecțios, dependente de numeroși factori și care se pot genera reciproc. Mai mult, se poate afirma, că totalitatea tipurilor de *Salmonella*, indiferent de originea lor, au o potențialitate patogenă a cărei exprimare este dependentă de natura relațiilor ce se stabilesc între organism și germeni, de doza ingerată, de particularitățile reactive ale organismului, de caracteristicile speciei de *Salmonella*, de intervenția unor factori cu acțiune stresantă, etc. Posibilitatea transmiterii salmonelelor de la purtător la alte organisme animale este îngăduită, într-o oarecare măsură de incapacitatea lor, luate în totalitate, de a se transmite la toate speciile animale.

Se poate afirma că, în cadrul genului *Salmonella* există unele specializări ecologice și de patogenitate, specializări care nu-și găsesc încă o explicație documentată științific, dar care incontestabil există. Astfel, nu se cunoaște care sunt factorii pe care îi posedă *Salmonella typhosa* sau *Salmonella gallinarum-pullorum*, care fac ca, în condiții naturale, una să fie patogenă numai pentru om, iar cealaltă numai pentru păsări, sau de ce unele specii de *Salmonella* au un spectru larg de patogenitate, cum sunt: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, etc., iar altele, unul îngust sau foarte îngust.

Păsările, aproape în totalitate, atât cele domestice cât și cele sălbatice, pot fi purtătoare și eliminatoare de salmonele și pot manifesta infecții clinice de o gravitate variabilă, dar în general severe și deseori mortale. Mai mult, ele stau în majoritatea cazurilor la originea toxiinfecțiilor alimentare la om.

Observațiile efectuate de Calnek (1997) au evidențiat că 94% din puii broileri, 87% din efectivele de curcani și 47% din găinile producătoare de ouă, sunt purtătoare de salmonele. Acest rezervor imens explică faptul că mai mult de 1/3 din infecțiile salmonelice la om se datoresc consumului de carne și ouă de pasăre. Din această cauză, problema infecțiilor salmonelice la păsări s-a transformat în ultimele decenii dintr-una predominant economică, într-una de sănătate publică, fiind în atenția forurilor de specialitate naționale și internaționale.

Având în vedere creșterea rolului păsărilor domestice și sălbatice, ca și a produselor acestora (carne și ouă) în apariția îmbolnăvirilor, dar și a toxiinfecțiilor alimentare la om, ne-am propus a investiga pe de o parte etiologia și prevalența (frecvența) infecțiilor paratifice la păsări, iar pe de altă parte prezența speciilor de salmonele în produsele avicole destinate consumului public.

Teza este alcătuită din două părți distincte. Prima parte, pe baza datelor bibliografice, reprezintă o sinteză a literaturii de specialitate. Între acestea sunt cuprinse referințe cu privire la morfologie, taxonomie, epidemiologia și metodologia de diagnostic a infecțiilor cu salmonele paratifice la păsări.

Partea a 2-a „Cercetări proprii” este redactată pe parcursul a 5 capitole și abordează o paletă largă de fațete.

În cap.5, s-a urmărit prezența și incidența speciilor de *Salmonella* în incubator, la păsările adulte, ca și la păsările imunizate activ, cu tulpina 9R. Astfel,

cercetările bacteriologice (subcap. 5.1) efectuate pe embrioni morți, pui neviabili și pe deșeuri de incubație au dus la izolarea unei flore bacteriene mixte, reprezentate de *Escherichia coli* (15,24%), *Proteus vulgaris* (12,26%), *Staphylococcus aureus* (7,61%) și *Salmonella spp.*(4,65%). Tulpinile de *Salmonella* au fost identificate biochimic și serologic ca *Salmonella djugu*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* și *Salmonella inganda*. Cele mai multe tulpini s-au izolat de pe cojile de ouă după ecloziune, urmate în ordine descrescătoare de ouă incubate și cele mai puține de la puii neviabili eclozionați.

De la păsările adulte (subcap. 5.2) din foliculii ovarieni modificați, ca formă și culoare și din ficat s-a izolat o floră reprezentată de *Salmonella enteritidis* (9,32%), *Salmonella typhimurium* (27,90%), *Escherichia coli* (27,90%), germeni coliformi (9,32%) și *Proteus vulgaris* (27,90%). Flora bacteriană a fost diferită în funcție de organ. Din foliculii ovarieni modificați s-a izolat *Salmonella typhimurium* și *Salmonella enteritidis*, în timp ce din ficat au predominat germenii Gram negativi reprezentați de *Escherichia coli* și germenii coliformi.

Examenul serologic (subcapitolul 5.3) efectuat prin reacția de hemoaglutinare rapidă după 13, 26, 34 și 45 de zile de la imunizarea păsărilor cu tulpina 9R au evidențiat reacții pozitive la 36 (2,45%) găini, iar din acestea 22 (75,80%) au reacționat pozitiv la titruri cuprinse între 1/20-1/640 la reacția de seroaglutinare lentă.

De la păsările cu reacții pozitive cu titru mai mare de 1/40 și cu leziuni de ooforită cronică și peritonită fibrinoasă, prin însămânțări pe medii de cultură, din foliculii ovarieni modificați ca formă și culoare, s-a izolat *Salmonella typhimurium*, dar nu *Salmonella gallinarum*, tulpina 9R.

Cercetările bacteriologice și serologice, privind determinarea stării de purtător și eliminator (Cap. 6) efectuate pe un număr de 20 păsări inoculate pe cale subcutanată și intramusculară, cu *Salmonella typhimurium* și *Salmonella enteritidis*, au evidențiat lipsa reacțiilor serologice pozitive, lipsa germenilor, în secrețiile uro-genitale și prezența germenilor pe coaja ouălor la 2 păsări în a 7-a zi după infecție. Examenul bacteriologic al ouălor de la găinile inoculate și incubate, ca și al puilor eclozionați a fost negativ ceea ce face să apreciem că starea de purtător nu se realizează în mod

obișnuit. În schimb, stadiul de excretor a fost evidențiat la 14-a și a 21-a zi după infecția pe cale subcutanată cu *Salmonella enteritidis*.

Cercetările epidemiologice și clinice efectuate într-un episod de paratifoză (Cap. 7) apărut în două hale de creșterea puilor cu un efectiv la populare de 47.405 (14.976 în H₁ și 32.429 în H₂), au evidențiat o mortalitate de 15,10%. În ambele hale, îmbolnăvirile au debutat exploziv, înregistrând un vârf la vârsta de 6 și respectiv 10 zile, s-au menținut crescute timp de 5-6 zile, după care au scăzut vertiginos.

Clinic, infecția paratifică a evoluat acut, cu manifestări de anorexie, polidipsie, imobilitate cu tendința de îngrămădire, horiplumație, diaree cu materii fecale apoase de culoare galben-verzuie, uneori cu striuri sanguinolente și sfârșit mortal după o evoluție 24-72 ore.

La necropsia puilor morți, leziunile macroscopice s-au încadrat în tabloul septicemiei paratifice tradus prin congestii și hemoragii pe seroase și în organele interne, focare necrotice miliare în ficat și cord, enterită cataral-hemoragică difuză sau congestivo-hemoragică la nivelul duodenului și sacul vitelin neresorbit.

Însămânțările pe mediile de cultură, efectuate din cadavrele de pui (cord, ficat, sac vitelin neresorbit), cât și de pe coaja ouălor, prelevate din incubator, au dus la izolarea agentului etiologic, identificat biochimic și serologic *Salmonella djugu*.

Sensibilitatea „in vitro” față de o gamă de substanțe antibacteriene (Cap. 8) s-a cercetat la 105 tulpini aparținând genului *Salmonella* izolate în perioada 2002-2006 din diverse materiale patologice (cadavre de pui, coaja ouălor de incubație, cadavre de păsări adulte, materii fecale de pasăre, deșeuri de incubație). Din acestea, 33 (31,42%) tulpini s-au izolat din cadavre de pui, 26 (24,75%) tulpini din cadavre de păsări adulte, 15 (14,23%) tulpini din materii fecale recoltate de la păsări și de la pui sănătoși, 18 (17,13%) tulpini de pe coaja ouălor și 13 (11,19%) tulpini din deșeuri.

Rezultatele obținute arată că sensibilitatea celor 105 tulpini de *Salmonella*, identificate serologic, față de activitatea substanțelor antibacteriene cercetate, diferă în funcție de serovariatate (de specie). Astfel, cele 59 tulpini de *Salmonella djugu* s-au dovedit foarte sensibile (100%) față de acțiunea amoxicilinei (59 tulpini), gentamicinei (59 tulpini), kanamicinei (59 tulpini) cloramfenicolului (59

tulpini), sensibilă la acțiunea eritromicinei (32 tulpini), furazolidonei (32 tulpini) și rezistentă față de activitatea substanțelor colistin (34 tulpini), streptomycină (25 tulpini), furazolidon (19 tulpini).

Cercetările privind incidența salmonelelor în carnea și organele de pasăre (Cap. 9) s-au efectuat pe un număr de 490 probe reprezentate din 310 carne de pui (pui Griller, pui calit. a I-a C+G, tacâmuri de găină sau pui) și 180 probe de organe (ficăței și pipote), recoltate din abatoare, din unități comerciale și de la gospodăriile populației. Din aceste probe, la examenul bacteriologic s-au izolat 18 (3,66%) tulpini de *Salmonella* spp., din care 8 (2,58%) din carne și 10 (5,55%) din organele de pasăre. Cele 18 tulpini izolate, biochimic și serologic au fost identificate ca *Salmonella Saint-Paul* (4 tulpini), *Salmonella enteritidis* (3 tulpini), *Salmonella typhimurium* (3 tulpini), *Salmonella agona* (2 tulpini), *Salmonella djugu* (2 tulpini), *Salmonella cholerae suis* (2 tulpini), *Salmonella dublin* (1 tulpină) și *Salmonella inganda* (1 tulpină).

ABSTRACT

Infections with salmonellas are frequent among mammals and birds, because of their wide distribution in nature. All *Salmonella* serotypes are parasites for human and animals. These kinds of germs are isolated from insects, reptiles, birds, mammals, humans and different environmental elements (soil, surface water, forage, food etc.). In the last years we assist to escalate of scientific papers which report the more frequent incidence of these germs.

Many of these serotypes are isolated from food, forage, nature, intestinal content of animals or human without being involved in pathological processes expressed clinical and immunological. These serotypes presence in organism can be translated as bearer and transmitter status, for different periods of time.

The problem becomes more sensitive in cases of salmonellas infections caused by rare serotypes. This is the reason why we must be careful and ask ourselves if this infection may be potentially pathogen. *Salmonella*'s presence can be related to carrier or disease status and represents a potentially pathogenetic factor for animals and human.

It is admitted that *Salmonella galinarum* and *Salmonella pullorum* represents specific causative agents for enzootic infections in chicken and other fowl, infections characterized by economical losses.

In spite of their specificity for chicken they can produce, under some circumstances, infections in other species including human.

Many serotypes without antecedents regarding pathogenicity proved later as potential pathogens for animals and human. Few researches studied the nature of relations established between salmonella's serotypes and host organism.

It seems hard to believe that very pathogenetic serotypes maintain an epifaunal status for a longer or less period.

These aspects led to belief that *Salmonellas* without pathogenicity do not induce an antibody response, because they don't interact with the host organism. Between conflict status and pathogenicity exist an interdependence relation.

There are signaled intestinal carrier statuses in swine, with *Salmonella choleraesuis* and in cattle, with *Salmonella enteritidis*, without specific antibodies presence in blood serum.

From various bacteriologic inquires results the complex nature of the relations established between host and germs. Generally these germs don't travel across gastro intestinal barrier; only in special cases they overcame this epifaunal status and penetrate this barrier, in a localized manner, in mesenteric lymph nodes and without immune phenomenon's.

Under some factors influence these dynamic equilibrium statuses can evolve in infectious diseases with septicemia.

That's why epifaunal status and localized infections must be seen as particular forms of the same infectious process. It can be revealed that all *Salmonella* serotypes, no matter their origin, are potentially pathogen. The pathogenicity expression is linked to relations established between hosts and germs, doses ingested, body reactive status, characteristics of the *Salmonellas* species involved, stress factors. *Salmonella* spread is limited by theirs incapacity to infect all animal species.

In the genus *Salmonella* exists several strains with ecologic and pathogenicity specializations, fact without scientific explanation.

The factors responsible for *Salmonella typhosa* limited pathogenicity to human or *Salmonella gallinarum-pullorum* in fowl are not known.

There are *Salmonella* species with a wide pathogenicity as *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* or species with a narrow pathogenicity.

Almost all fowl, domestic or wild, are carrier for *Salmonella* and manifests infections with variable degrees of the clinical expression. Generally these infections are severe and often deadly. Moreover these infections lay behind alimentary infections in human.

Calnek's observations proofs that 94% from chicks, 87% from turkey's herds and 47% from chickens are *Salmonella* carriers. This huge *Salmonella* reservoir explains the fact that more than one third of salmonella infections in human are caused by flash or egg consume. That's why salmonella infections in fowl turnover in a public health safety problem from an economic interest problem.

Considering fowl products importance, flesh and eggs, in human alimentary infections, we initiated a study regarding etiology and frequency of salmonella infections in birds. On the other side we investigated the appearance of the *Salmonella* species in alimentary products for human consumption.

The PhD thesis gathers two distinct chapters. First part based on bibliographic data, represents a synthesis of the specialty literature. This chapter gathers references regarding morphology, taxonomy, epidemiology and diagnostic procedures of the *Salmonella* infections in fowl.

Second part of the PhDs thesis represents the personal researches and gathers five subchapters.

In the fifth chapter are presented ours researches regarding presence and incidence of salmonella species in the incubator, at the adult fowl and active immunized birds with 9r strain.

The bacteriological assay (subchapter 5.1), made on dead embryos, unviable chicks and incubation trash, leded to isolation of *E. coli* (15.24%), *Proteus vulgaris* (12, 26%), *Staphylococcus aureus* (7, 61%), and *Salmonella species* (4.65%). The salmonella strains identified using biochemical and serological tests are: *Salmonella djugu*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella inganda*. Most of these strains were isolated from eggs shell after chicks hatch, incubated eggs and in a limited manner from unviable chicks hatched.

In adult birds from modified ovarian follicles, as shape and color, and liver were isolated: *Salmonella enteritidis* (9.32%), *Salmonella typhimurium* (27,9%), *Escherichia coli* (27,9%), Coliforms (9,32%) and *Proteus vulgaris* (27,9%). The microflora structure depended by origin organ. From modified ovarian follicles were isolated *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. In liver the predominant germs were the gram negative one represented by coliforms and *E coli*.

The serological exam (subchapter 5.3) used the fast hemagglutination reaction after 13, 26, 34, and 45 weeks from birds' immunization using the 9R strain.

Positive reaction presented 36 chickens (2, 45%), from which 22 individuals responded positive to slow seroagglutination at titers between 1/20-1/640.

Salmonella typhimurium was isolated from birds with oophoritis and fibrinous peritonitis, from ovarian follicles modified as color and shape. These birds presented positive reactions with a titers higher than 1/40. *Salmonella galinarum* strain 9R wasn't isolated.

Bacteriological and serological researches regarding carrier and eliminator status (chapter 6) were done on 20 birds inoculated subcutaneously and intramuscularly with *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. These researches show the lack of positive serological reactions, germs absence in uro-genital secretions and germs presence in eggs shell after seventh day after inoculation.

Bacteriological exam of the eggs from birds inoculated, and chicks hatched from those eggs were negative, fact leading us to conclusion that carrier status isn't realized usually. Excreting status was proved after 14th and 21 day after subcutaneously inoculation with *Salmonella enteritidis*.

In chapter 7 are presented epidemiological and clinical researches during a paratyphoid outbreak in a 47405 bird flock, with 15.1% mortality. The outbreak started suddenly, recording a peak after 6-10 days after disease begin. The disorder rised to a plateau and kept this way 5-6 days than dropped vertiginously.

Clinically, paratyphoid infection had an acute evolution with anorexia, polydipsia, diarrhoea with water like feces, sometimes with blood stria and death after 24-72 hours.

Chicks necropsy revealed the following macroscopic lesions: internal organs congestion with hemorrhagic aspect, focal necrotic liver and heart lesions, enteritis and unabsorbed yolk.

After isolating the etiologic agent, *Salmonella djugu* was identified using biochemical and serological methods.

Sensitivity for different antimicrobial substances was tested "in vivo" using 105 salmonella strains, isolated between year 2002 and 2006 from various pathological materials (dead chicks, eggs shell, adult fowl, feces, incubation waste). From those 33 strains (31, 42%) were isolated from chick's cadavers, 26 strains (24, 75%) from adult chickens, 15 strains (14, 23%) from healthy bird's feces, 18 strains (17, 13%) from eggs shell and 13 strains (11, 19%) from incubation waste.

From the results obtained outcomes the fact that antimicrobial substances activity differ by bacterial strain.

All the *Salmonella djugu* strains (59 strains) were sensitive to: amoxicillin, gentamicin, kanamycine, chloramphenicol. 32 strains were sensitive to erythromycin and nitrofurantoin. To streptomycin were sensitive only 25 strains.

Researches regarding *Salmonella* presence in fowl flesh and organs were done using 490 samples collected from different slaughtering units and commercial units or. From these samples were isolated 18 *Salmonella Spp.* Strains, eight from flesh and ten from organs. The identified strains were: *Salmonella Saint-Paul* (4 strains), *Salmonella enteritidis* (3 strains), *Salmonella typhimurium* (3 strains), *Salmonella agona* (2 strains), *Salmonella djugu* (2 strains), *Salmonella cholerae suis* (2 strains), *Salmonella dublin* (1 strains) și *Salmonella strains* (1 strain).