

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Medicină veterinară

BĂRBĂLAN I. ALIN GABRIEL

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND RISCUL MICROBIOLOGIC GENERAT
DE PREZENȚA SALMONELELOR ÎN ALIMENTE ȘI FURAJE**

Conducător Științific

Prof. Dr. TÎRZIU EMIL

Timișoara

2021

Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine
"King Mihai I of Romania" from Timisoara



Faculty of Veterinary Medicine

BĂRBĂLAN I. ALIN GABRIEL

THESIS

**RESEARCH ON THE MICROBIOLOGICAL RISK
GENERATED BY THE PRESENCE OF SALMON IN FOOD
AND FEED**

Doctoral supervisor

Prof. Dr. TÎRZIU EMIL

**Timișoara
2021**

Rezumatul tezei de doctorat

Cercetări privind riscul microbiologic generat de prezența salmonelelor în alimente și furaje

Prezenta teză conține:

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Partea I-a - Cercetări bibliografice: 40 de pagini

Partea a II-a - Cercetări proprii: 93 pagini

Tabele: 40

Figuri: 75

Surse bibliografice: 295

Lista lucrărilor științifice publicate

Scopul și obiectivele cercetării

Bacteriile aparținând genului *Salmonella* cauzează diverse simptome clinice, de la infecții asimptomatice până la sindroame “*typhoid-like*” la copii sau la animalele cu înaltă susceptibilitate. La persoanele adulte salmonelele sunt, în general, responsabile de producerea toxiinfecțiilor alimentare.

Din acest motiv, salmonelozele sunt considerate zoonoze specifice, cu o răspândire universală, unele tulpini fiind ubicvitare, iar altele având caracter regional. În prezent, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) consideră salmoneloză ca fiind una dintre cele mai importante boli provocate de consumul alimentelor contaminate. Dintre speciile genului, *Salmonella enterica* este incriminată ca fiind cea mai importantă cauză a toxiinfecțiilor alimentare cu riscuri serioase, în ceea ce privește sănătatea omului, la nivel mondial. Global, este estimat că infecțiile cu *Salmonella* netifoidă variază între 200 milioane și 1.3 miliarde, cu o mortalitate de aproximativ trei milioane în fiecare an. De exemplu, în fiecare an, numai în SUA, 1.4 milioane de oameni sunt infectați cu *Salmonella* netifoidă, rezultând aproximativ 400 de morți.

În baza datelor raportate de statele membre ale Uniunii Europene, se poate observa că salmonelele reprezintă microorganismele asociate celui mai înalt risc de toxiinfecție alimentară, fiind identificate într-o largă categorie de alimente, de origine animală și non-animală, inclusiv în furaje. De asemenea, carnea și produsele obținute din carne reprezintă o categorie de alimente cu importanță majoră pentru declanșarea fenomenelor patologice.

Caracteristica de bază a contaminării cu *Salmonella* este aceea că nu apar modificări organoleptice care să atragă atenția asupra posibilei prezențe a germenilor, alimentele având nemodificate aspectul, culoarea, mirosul și gustul. În ceea ce privește condițiile de prelucrare și depozitare a produselor alimentare, trebuie avut în vedere faptul că temperatura minimă de dezvoltare a salmonelelor este de 7°C, temperaturile de refrigerare împiedicând multiplicarea acestora, dar nerealizând distrugerea lor. În condiții necorespunzătoare de depozitare timpul necesar înmulțirii de zece ori a unei populații de *Salmonella* este de 24 de ore la 15,6°C și doar de nouă ore la 21°C.

Din aceste considerente, controlul bacteriologic al produselor alimentare, condițiile igienice în unitățile de comercializare, abatoare și fabrici de preparare, stocarea refrigerată a tuturor produselor alimentare potențial contaminate, transportul ambalat etanș, procesarea tehnologică atent controlată pentru evitarea încrucișării materiilor prime cu produsele finite și consumul imediat al alimentelor preparate prin căldură sunt măsuri de bază în profilaxia toxiinfecțiilor alimentare cu *Salmonella* spp.

Menționăm că, dimensiunile foarte mari pe care le îmbracă episoadele generate de alimentele prelucrate industrial, justifică un control permanent al acestora chiar și în circumstanțe aparent lipsite de risc. Izolarea și identificarea salmonelelor din produsele alimentare implică mari dificultăți, spre deosebire de izolarea din cadavre

sau din produse patologice. Aceasta, din următoarele două motive principale: contaminarea alimentelor cu salmonele coexistă cu altă floră normală, care de obicei reprezintă flora concurentă, și se găsește într-o proporție mult mai mare. În cele mai multe alimente, care au suferit diferite tratamente fizice și chimice, salmonelele se găsesc sub formă latentă, din care cauză decelerarea lor impune condiții speciale de investigație.

Toate aceste direcții de cercetare au permis conturarea studiului de față, care are ca obiectiv general studiul unor tulpini de *Salmonella* izolate din carne, preparate din carne, inclusiv pastă de mici, dar și din preparate de cofetărie, coajă de ou, teamea și nutreț combinat. Dintre obiectivele specifice ale acestui studiu, menționăm:

- izolarea și identificarea salmonelelor din carne, preparate din carne și pastă de mici, dar și din preparate de cofetărie, coajă de ou, teamea și nutreț combinat, cu ajutorul metodelor bacteriologice clasice, standardizate;
- studiul comportamentului salmonelelor pe medii uzuale, standardizate, și selective pentru enterobacteriaceae;
- studiul comportamentului biochimic al unor tulpini de *Salmonella* pe medii multitest, inclusiv cu ajutorul sistemului *Api 20E* (BioMérieux, Franța);
- identificarea serogrupelor și serovarurilor de *Salmonella* cu ajutorul metodelor serologice clasice (aglutinare rapidă și aglutinare lentă) și moderne, rapide (ELISA, VIDAS);
- cercetări privind comportamentul unor serovaruri de salmonele identificate din probele recoltate din diverse alimente de origine animală și non-animală, inclusiv nutreț combinat, față de unele substanțe antimicrobiene;
- caracterizarea moleculară a unor serovaruri de *Salmonella* izolate din carne și semipreparate din carne prin tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR).

Partea I-a **Stadiul actual al cunoașterii**

Este extinsă pe 40 de pagini (30,08% din teză), fiind structurată pe trei capitole, care includ 11 subcapitole

Capitolul I. Considerații generale privind rolul alimentelor în apariția unor boli de origine alimentară la om

Cuprinde informații recente referitoare la rolul alimentelor în producerea unor boli și a unor toxiinfecții alimentare la om, consecutiv contaminării realizate de germenii microbieni. În prezent, îmbolnăvirile apărute în urma consumului de alimente de origine animală și non-animală, dețin o pondere importantă în domeniul sănătății publice, mai ales în contextul legislativ european actual, în care în ultimii ani s-au produs modificări importante atât în ceea ce privește condițiile de obținere cât și de comercializare a alimentelor.

Dintre cauzele emergenței continue a toxiinfecțiilor alimentare se pot aminti: fenomenul de globalizare a rezervelor de hrană și introducerea agenților patogeni în noi zone geografice, expunerea la riscuri legate de consumul alimentar hazardat (călătorii, refugiați); modificări ale microorganismelor, care pot determina apariția unor noi patogeni, inclusiv prin dezvoltarea unor noi tulpini virulente, dezvoltarea rezistenței la antibiotice, adaptarea la condițiile de mediu, modificări la nivelul populației umane (creșterea susceptibilității la infecții, îmbătrânirea populației, malnutriția etc.), modificări în stilul de viață (consumul de alimente de tip fast food, consumul de alimente de la vânzători ambulanți) etc.

Având în vedere aceste aspecte, profilaxia și combaterea toxiinfecțiilor alimentare includ măsuri complexe, care vizează atât educarea celor care manipulează alimentele pentru menținerea igienei corespunzătoare în unitățile de sacrificare, preparare și comercializare, dar și prepararea adecvată a alimentelor, refrigerarea corectă a acestora și prevenirea contaminării încrucișate, pasteurizarea laptelui, măsuri de igienă personală și reducerea contaminării carcaselor în abatoare.

În prezent, este unanim acceptat că majoritatea cazurilor de toxiinfecții alimentare, au ca agent etiologic principal diverse specii bacteriene aparținând genului *Salmonella*. În baza datelor raportate de către statele membre ale CE, se poate observa că salmonelele reprezintă microorganismele asociate celui mai înalt risc de toxiinfecție alimentară. Dintre alimente putem menționa, ca sursă principală, carnea și produsele din carne, laptele și produsele lactate, peștele și produsele din pește, ouăle și produsele din ouă, inclusiv fructele și legumele, iar dintre animale găinile ouătoare, pe locul imediat următor ca importanță clasându-se curcanii, rațele și găștele urmate de porci și bovine.

Capitolul 2. Caracteristici generale ale genului *Salmonella*

Include informații „la zi” referitoare la încadrarea taxonomică a enterobacteriaceelor în general și a speciilor aparținând genului *Salmonella* în special, aspecte de ecologie și de epidemiologie, principalele caractere morfo-culturale și biochimice, structura antigenică, rezistența la factorii de mediu și la substanțele antimicrobiene, precum și aspecte de patogeneză și infecție naturală.

Taxonomia și nomenclatura enterobacteriaceelor reprezintă, și în prezent, o problemă de mare actualitate deși, în timp, s-au făcut numeroase încercări de sistematizare. Conform datelor din literatura de specialitate există numeroase abordări privind taxonomia și structurarea bacteriilor aparținând familiei *Enterobacteriaceae*.

În prezent, pentru a evita confuziile determinate de frecvențele modificări taxonomice în cadrul genului *Salmonella*, taxonomiștii actuali sugerează păstrarea nomenclurii propuse de Centrul Internațional OMS - Paris care se aplică în practica medicală și medicală veterinară și în țara noastră. Astfel, în conformitate cu sistemul CDC, genul *Salmonella* include două specii, *Salmonella enterica*, specia tip și *Salmonella bongori*. La acestea în 18 martie 2005, s-a adăugat o nouă specie, *Salmonella subteranea*, izolată și identificată de Shelobolina și colab., și publicată în lista de validare.

În subcapitolul „*Ecologia și epidemiologia salmonelelor*”, sunt identificate principalele nișe și vectorii, cu importanță majoră în apariția toxiiinfecțiilor alimentare. Dintre acești factori, alimentele și furajele joacă un rol dominant, iar mediul înconjurător și vectorii au o poziție centrală ce explică amplificarea difuziunii în alimente și furaje. De asemenea, factorul uman, ca sursă primară, joacă un rol contaminant modest al alimentelor și furajelor.

Epidemiologic, Jay și col. propun următoarea clasificare a salmonelelor: salmonele care infectează numai omul: *S. typhi* și *S. paratyphi* (agenții febrei tifoide și paratifoide); salmonele cu specificitate de gazdă: *S. abortus-equi* (cabaline), *S. abortus-ovis* (ovine), *S. cholerae-suis* (suine), *S. dublin* (viței) și *S. gallinarum* (păsări), unele dintre ele patogene și pentru om; salmonele neadaptate (fără preferință de gazdă), patogene atât pentru om cât și pentru animale

Tot în cadrul acestui capitol sunt descrise principalele aspecte morfologice, culturale, biochimice și antigenice ale speciilor încadrate în genul *Salmonella*. Menționăm în mod deosebit caracterele biochimice, elemente extrem de importante în identificarea și încadrarea salmonelelor, dar și a structurii antigenice, cu rol determinant în precizarea serogrupelor și serovarurilor de salmonele.

Rezistența salmonelelor la factorii fizico-chimici, cuprinde o trecere în revistă a celor mai importanți factori de mediu care condiționează activitatea microbiană a salmonelelor determinând fie stimularea creșterii și reproducerii fie inhibarea activității (inactivarea microorganismelor).

Comportamentul salmonelelor față de substanțele antimicrobiene este o sinteză a cunoștințelor actuale privind sensibilitatea întâlnită la speciile genului *Salmonella*. Datele prezentate sunt extreme de importante în contextul în care rezistența fenotipică și genotipică, întâlnită la unele serovaruri de *Salmonella*, izolate de la animale, nu sunt similare cu cele izolate din carnea provenită de pe fluxul de abatorizare. Un număr mare de studii, realizate în ultimii ani, au evidențiat, rezistența antimicrobiană fenotipică în cadrul serotipurilor de *Salmonella* izolate din alimente.

Subcapitolul „Elemente de patogeneză”, cuprinde informații recente care demonstrează capacitățile agresive ale salmonelelor prin ambele mecanisme de patogenitate recunoscute la bacterii: virulență și toxigenitate.

Capitolul 3. Metode de izolare și identificare a salmonelelor

Prezintă succint cele mai utilizate metode de diagnostic a salmonelelor. Diagnosticul salmonelelor se încadrează în metodologia generală de izolare a agentului etiologic de la pacient și alimentul incriminat. Astfel, în acest studiu, sunt prezentate atât *sistemele convenționale*, prin folosirea schemelor simple de determinare, sau a schemelor mai complexe, utilizate de laboratoarele de microbiologie clinică, cât și *sistemele multitest*, care utilizează mai multe elemente de identificare, dar și *sistemele microtest*.

Partea a II-a. Cercetări proprii

Această parte se extinde pe 93 de pagini (69,92% din teză) și include șase capitole mari, la care se adaugă concluziile generale.

Capitolul 4. Scopul și obiectivele cercetării

La ora actuală, pentru izolarea și identificarea salmonelelor, sunt utilizate un număr mare de metode de detectare, multe dintre ele disponibile în comerț. Testele de screening pentru *Salmonella* variază de la proceduri complexe, care includ tehnici laborioase (metoda cu agar așezat în strat subțire sau separarea imunologică), până la teste simple, de flux lateral, încorporate în tehnologia imunocromatografică. Până în prezent au fost validate peste treizeci de metode alternative de detectare a salmonelelor, majoritatea lor fiind teste imunoenzimatică sau de biologie moleculară. Probele preîmbogățite pot fi analizate direct, prin teste imunoenzimatică, sau după o etapă scurtă de fierbere, metodele putând fi automate, îmbunătățind astfel eficacitatea testelor și reducând greșelile umane.

Având în vedere aspectele menționate mai sus, obiectivul principal al cercetărilor proprii a constat în evaluarea unor metode de izolare și identificare a bacteriilor din genul *Salmonella*, din diverse probe, prelevate din produse de origine animală și non-animală.

Pentru realizarea principalului obiectiv al cercetării s-au avut în vedere mai multe obiective specifice, dintre care menționăm: izolarea și identificarea salmonelelor din probe prelevate din produse de origine animală și non-animală, cu ajutorul metodelor bacteriologice clasice, standardizate; cercetări privind comportamentul salmonelelor pe medii selective pentru enterobacteriaceae; cercetări privind comportamentul biochimic al unor tulpini de *Salmonella* pe medii multitest, precum și cu sistemul *Api 20E* (BioMérieux, Franța); identificarea serogrupelor și serovarurilor de *Salmonella* folosind metodele serologice clasice (aglutinare rapidă și lentă) și rapide (ELISA, VIDAS); cercetări privind comportamentul serovarurilor de salmonele identificate, față de unele substanțe antimicrobiene, atât prin metoda difuzimetrică cât și cu sistemul Vitek-2 Compact; caracterizarea moleculară a unor tulpini de *Salmonella* izolate din carne și semipreparate din carne, prin tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR).

Capitolul 5. Investigații privind izolarea salmonelelor din alimente prin metode clasice

Materiale și metode

Cercetările s-au desfășurat pe parcursul a cinci ani, în perioada 2016 - 2020, luându-se în studiu un număr de 4707 probe, reprezentate de carne de pasăre, porc și vită (crudă și tocată), pastă de mici, preparate din carne de porc (cârnați, kaizer), telemea de vacă, produse de patiserie (tartă de fructe, prăjituri), coajă de ou și nutreț combinat, provenite din unități de procesare și comercializare de pe raza a două județe din sudul țării.

Unitățile din care s-au recoltat probele au fost următoarele: un abator de carne roșie, un abator de carne de pasăre, măcelării, unități specializate de obținere a cărnii și a preparatelor din carne, unități de desfacere (supermarketuri, cofetării, magazine alimentare de cartier) etc. Probele de carne refrigerată și tocată au provenit de la trei specii (pasăre, porc, vită), în timp ce probele de carne preparată au provenit numai de la porc și vită, inclusiv carne preparată amestec.

Probele recoltate și individualizate, prin număr de ordine, au fost etanșeizate pentru a exclude diseminarea germenilor în mediul ambiant și s-au expediat rapid la laborator, unde au fost supuse investigațiilor bacteriologice vizând izolarea, identificarea, și serotipizarea germenilor, conform standardelor în vigoare. Astfel, probele prelevate au fost analizate, utilizând metodologia prevăzută în SR EN ISO 6579/2003 AC/2006 (Asociația pentru Standarde Române, 2003), precum și SR EN ISO 10272/2006.

În cadrul experimentelor efectuate am utilizat metode de examinare standardizate, în primul rând, examenele bacteriologice clasice (examene bacterioscopice, culturale, izolarea și identificarea salmonelelor) din carne de pasăre, porc și vită (crudă și tocată), pastă de mici, preparate din carne de porc (cârnați, kaizer), telemea de vacă, produse de patiserie (tartă de fructe, prăjituri), coajă de ou și nutreț combinat.

Rezultate obținute

Și la ora actuală metodele bacteriologice clasice asigură, pe lângă izolarea bacteriilor, și identificarea diferitelor caractere morfologice și culturale, pe baza cărora se poate face încadrarea tulpinilor în specii și genuri. În plus, examenul bacteriologic oferă și indici referitoare la sursa de infecție, devenind astfel posibilă eliminarea sa.

În urma efectuării experimentelor de laborator s-a constatat că toate enterobacteriile prezintă proprietatea de a fi Gram-negative, au dimensiuni medii, la fel ca multe alte bacterii din alte genuri și familii. Cu toate acestea microscopia directă nu este, de obicei, utilă în identificarea salmonelelor. Menționăm însă că, în urma examinării culturilor, obținute consecutiv însămânțării din probele de cercetat, au fost evidențiați germeni de formă bacilară și cocobacilară, cu dimensiuni cuprinse între 2-4/0,5-0,7 μm, Gram negativi, necapsulați, nesporulați, dar ciliați, care pot fi încadrați în grupul salmonelelor.

Examenle de laborator, vizând decelerarea salmonelelor din probele luate în studiu, au fost efectuate conform metodei internaționale de referință standardizate (SR EN ISO 6579), cu parcurgerea obligatorie a etapelor de preîmbogățire și îmbogățire, premergătoare izolării salmonelelor.

Utilizarea concomitentă și comparativă a unei game lărgite de medii specifice pentru izolarea salmonelelor a dovedit performanțele superioare ale mediului Rambach, un mediu cromogen, care asigură detectarea fără dubii a tulpinilor de *Salmonella*, ceea ce a redus cu mult, timpul și volumul de investigații, deziderat extrem de important pentru promptitudinea diagnosticului, atât de necesară pentru depistarea și prevenirea episoadelor de salmoneloză umane și animale.

Reușita izolării, cu o rată înaltă a salmonelelor, a fost influențată, într-o mare măsură, de utilizarea unor scheme clasice de diagnostic, cu alegerea mediilor adecvate și executarea corectă și cu acuratețe a tehnicilor de lucru, precum și de felul și calitatea materialului patologic examinat.

În concluzie putem afirma că metodele convenționale de izolare și identificare, deși necesită un volum mare de muncă, iar rezultatele sunt uneori tardive pentru a putea lua decizii clinice și epidemiologice eficiente, rămân totuși de „referință” pentru toate celelalte sisteme de investigare a echipamentului exoenzimatic al salmonelelor.

Capitolul 6. Cercetări privind comportamentul biochimic al unor tulpini de *Salmonella* spp., izolate din produse de origine animală și non animală

Obiectivul studiului

Cercetările au vizat încadrarea tulpinilor bacteriene, al căror comportament, bacterioscopic și bacteriologic, nu a permis încadrarea în caracteristicile specifice bacteriilor din genul *Salmonella*, prin studiul mobilității germinilor, a caracteristicilor biochimice de fermentare a zaharurilor și a utilizării citratului ca unică sursă de carbon.

Materiale și metode

Pentru efectuarea cercetărilor s-au folosit colonii repicate din culturi bacteriene, obținute pe medii selective de izolare, și suspecte ca aparținând genului *Salmonella*, care, într-o primă etapă, au fost transplantate pe agar nutritiv, iar ulterior pe medii selective pentru evidențierea caracteristicilor biochimice. În cadrul metodologiei de lucru, identificarea enterobacteriaceelor în general, și a speciilor aparținând genului *Salmonella* în special, prin teste biochimice convenționale, pe seturi de diagnostic diferențial, constituie metoda la care se raportează toate celelalte metode moderne de identificare.

În cadrul cercetărilor efectuate, din toate probele de carne, semipreparate din carne, inclusiv pastă de mici, telemea, preparate de cofetărie, coajă de ou și nutreț combinat, pe parcursul perioadei de studiu, cuprinsă între 2016-2020, au fost izolate și încadrate, într-o primă etapă, în grupul salmonelelor, un număr de 175 tulpini. În continuare, acestea au fost supuse examenelor de laborator pentru evidențierea caracterelor biochimice, în scopul confirmării și încadrării în gen. În acest scop, în urma izolării inițiale, coloniile cu caractere morfologice și culturale, caracteristice pentru speciile genului *Salmonella*, au fost studiate și în ceea ce privește echipamentul metabolic, prin pasarea pe medii politrope (medii de cultură multitest) sau, în funcție de necesitate, și pe teste individuale, precum și pe sisteme microtest (ex. Api 20 E).

Acuratețea lucrărilor efectuate a fost confirmată de laboratorul național de referință, din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală și I.N.C.D.M.I. Cantacuzino, unde diagnosticul de certitudine se asigură prin tipizare biochimică, bacteriocinotipie și lizotipie, pentru tulpinile de interes epidemiologic deosebit.

Rezultate obținute

La analiza rezultatelor s-a constatat, în ceea ce privește comportamentul pe mediul TSI, o reacție tipică pentru *Salmonella* în mediul TSI. Cu toate acestea, numeroși cercetători afirmă că *Salmonella choleraesuis* nu produce H₂S, deși *Salmonella choleraesuis* biotipul Kunzendorf este H₂S pozitiv, iar pretențiosul *Salmonella typhi suis* este variabil în ceea ce privește producția de H₂S.

În experimentele efectuate de noi, la examinarea tuburilor însămânțate, tulpinile de *Salmonella* spp. luate în studiu au avut următorul comportament biochimic: toate cele 175 de tulpini au fermentat glucoza, determinând virarea culorii coloanei mediului în roșu, în schimb numai 139 (78,53%), din totalul de 175 de tulpini izolate, au produs H₂S, reacție vizibilă prin înnegrirea mediului în porțiunea dreaptă și porțiunea înclinată, comparativ cu *E. coli* la care culoarea a rămas nemodificată

Pe mediul MIU, tulpinile de *Salmonella*, izolate în urma însămânțării pe mediile selective, au avut o reacție pozitivă la descompunerea ureei, culoarea mediului virând în galben, și o reacție negativă la producerea indolului, evidențiată prin absența formării inelului de culoare roșie la suprafața mediului, care este prezent în cazul cultivării *E. coli*. Menționăm că, dintre cele 175 tulpini de *Salmonella* luate în studiu, nu s-a constatat prezența mobilității la 15 tulpini, deși toate cele 15 tulpini au produs H₂S, în urma însămânțării pe mediul TSI.

Mediul SIM a fost utilizat, alături de mediile TSI și MIU, pentru identificarea biochimică a tulpinilor de *Salmonella* izolate pe mediile selective, punându-se în evidență producerea H₂S, prin înnegrirea întregii coloane a mediului la 32 de tulpini de *Salmonella* la care reacția a fost negativă pe mediul TSI.

Cu ajutorul sistemelor *microtest*, în urma efectuării experimentelor, din cele 4707 probe au fost izolate, identificate și confirmate prin testele de laborator 175 de tulpini, aparținând genului *Salmonella*.

Analizând rezultatele obținute în urma examinării celor 175 de tulpini, aparținând genului *Salmonella*, se constată o frecvență diferită de la un an la altul, dar cu o evoluție ascendentă până în anul 2019, când au fost detectate cele mai multe probe pozitive pentru *Salmonella*. De reținut că în statele UE, raportul EFSA din 2018 a evidențiat o reducere a incidenței salmonelelor în produsele alimentare, începând cu anul 2014, pentru ca, în anul 2018, să se revină la valori apropiate de cele înregistrate în anul 2014.

În funcție de natura probelor analizate, se poate observa că ponderea cea mai mare au avut-o tulpinile de *Salmonella* izolate din pasta de mici, respectiv 58 de tulpini (15,26 % din totalul de 175 de tulpini) urmată de carnea tocată de porc, 26 de tulpini (4,68 %), piept de pui, 14 tulpini (5,91%), carne proaspătă de pasăre, zece tulpini, și carne tocată de vită, tot zece tulpini (2,58%).

Dintre speciile de animale, de la care au provenit cele mai multe probe pozitive, se poate afirma că suinele reprezintă principala specie incriminată, fiind urmate de galinacee și bovine. În cazul probelor recoltate de pe coajă de ou, telemea, produse de patiserie și nutreț combinat, cele mai multe tulpini de *Salmonella* au fost izolate de pe coajă de ou, șapte tulpini (3,13%), apoi câte șase tulpini din telemea și nutreț combinat (2,87 și respectiv 4,48%).

La polul opus se plasează probele recoltate din carne proaspătă de vită și gât de porc, din care s-a identificat o singură tulpină de *Salmonella*, respectiv 0,69% din totalul probelor analizate (145 de probe recoltate din carne proaspătă de vită și tot 145 probe din gât de porc), corespunzător unei prevalențe de 1,48%, raportată la numărul de probe de acest tip analizate, și de 0,2%, raportată la numărul total de probe luate în studiu.

În concluzie, putem afirma că, din numărul total de 4707 probe prelevate și examinate, au fost izolate și identificate, în baza comportamentului bacterioscopic, cultural și biochimic, 175 de tulpini de *Salmonella* (3,72%), rezultate confirmate ulterior și prin testele serologice. Galeriile API 20 E au asigurat o caracterizare biochimică, a tulpinilor de *Salmonella* izolate (20 de proprietăți biochimice), mult mai complexă și, prin urmare, un diagnostic mult mai sigur, mai ales în situațiile în care s-a constatat o mai mare variabilitate în ceea ce privește calitatea diferitelor șarje de medii politrope utilizate.

Capitolul 7. Cercetări privind identificarea serogrupelor și serovarurilor de *Salmonella*

Obiectivul studiului

Obiectivul principal a constat în încadrarea în serogrupe și serovaruri a tulpinilor de *Salmonella* izolate din probele de carne, semipreparate din carne, telemea, coajă de ou, produse de cofetărie și nutreț combinat. În cadrul obiectivelor specifice s-a urmărit, atât serotipizarea tulpinilor prin metode clasice (teste de aglutinare, rapide și lente), cât și o evaluare a metodelor rapide de detectare a tulpinilor de *Salmonella* spp.

Materiale și metode

După cum este cunoscut, pentru identificarea serologică a principalelor serovaruri, încadrate în genul *Salmonella*, și diferențierea acestora de celelalte *Enterobacteriaceae*, sunt importante trei tipuri de antigene, respectiv: *antigenele somatice* (O) și *antigenele flagelare* (H), prezente la toate serovarietățile de *Salmonella* (excepție *S. pullorum* și *S. gallinarum*, care sunt imobile), precum și la alte *Enterobacteriaceae*, la care se adaugă și *antigenele de înveliș* (Vi), (prezente doar la *S. typhi*). Astfel, în practica identificării antigenice, se determină inițial factorii „O”, prin reacții de aglutinare rapidă pe lamă, care permit încadrarea într-un grup serologic, apoi, în interiorul grupului, identificăm factorii de tip „H” prin metoda de seroaglutinare Kauffmann White.

Pentru efectuarea reacțiilor serologice clasice au fost utilizate seruri anti-salmonele, care conțin anticorpi specifici pentru fiecare grupă de ser O, H și Vi, fiind utilizate în practică pentru determinarea serotipurilor de *Salmonella* prin reacția de seroaglutinare pe lama și aglutinare lentă în microplăci. Pentru efectuarea testelor serologice clasice au fost utilizate seruri antisalmonele, produse de S.C. Sanimed International Impex S.R.L. și de Pro-Lab Diagnostics Canada. În cadrul acestor experimente ne-am propus și o evaluare a metodelor rapide de detectare a tulpinilor de *Salmonella* spp., într-un interval de timp cât mai scurt, din probe de carne, semipreparate,

produse de patiserie, telemea, coajă de ou și nutreț combinat, îmbogățite în prealabil în apă peptonată tamponată, utilizând atât o metodă imunoenzimatică calitativă cât și testul VIDAS.

Menționăm că sistemul VIDAS *Salmonella*, validat în anul 1994 de AFNOR (Asociația Franceză pentru Standardizare), în conformitate cu metoda de referință descrisă în standardul internațional ISO 6579, constituie o metodă rapidă de analiză pentru toate produsele alimentare destinate consumului uman sau animal. Testul automat miniVIDAS utilizează tehnologia ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) și are ca principiu de bază detecția antigenelor de *Salmonella* spp., potențial prezente în probele de carne, preparate din carne și alte produse de origine animală și non animală, prin tehnica imunoenzimatică de fluorescență.

Rezultate obținute

Din probele prelevate au fost supuse studiului, cu ajutorul reacțiilor de aglutinare, un număr de 175 tulpini de *Salmonella*. În urma efectuării testelor, din cele 175 de tulpini, 89 de tulpini (50,86%) au fost încadrate în grupul serologic B, 60 de tulpini (34,09%) au aparținut grupului serologic C, 7 tulpini (4,00%) au fost încadrate în grupul D, 17 tulpini (9,71%) în grupul E și două tulpini (1,14%) au fost încadrate în grupul G.

Cele 175 de tulpini de *Salmonella* spp. izolate din carne (proaspătă și tocată), semipreparate din carne, produse de patiserie (tartă de fructe, prăjitură), coajă de ou și nutreț combinat au aparținut unui număr de 20 de serovaruri, distribuite astfel: cinci serovaruri în serogrupul B, nouă în serogrupul C, un serovar în serogrupul D, patru în serogrupul E și un serovar în serogrupul G.

Raportată la numărul total de tulpini de *Salmonella* spp. izolate și identificate (n=175), incidența serovarurilor, determinată prin teste serologice, a fost variabilă de la un serogrup la altul. Astfel, în serogrupul **B** serovarurile identificate mai frecvent au fost *S. Typhimurium* (56,72%), *S. Derby* (17,91%) și *S. Bredeney* (16,42%) în timp ce *S. Brandenburg* și *S. Gloucester* au fost izolate doar din trei probe (4,48%); în grupul **C**, *S. Infantis* (41,33%), *S. Rissen* (25,33%) și *S. Virchow* (14,67%) au fost serovarurile izolate cel mai frecvent, urmate de *S. Mbandaka* (6,67%), *S. Kottbus* (5,33%) și *S. Newport* (2,67%) în timp ce serovarurile *S. Amherstiana*, *S. Djugu* și *S. Litchfield* au fost izolate numai din câte o singură probă (1,33%); în serogrupul **D**, a fost încadrat un sigur serovar, respectiv *S. Enteritidis*, izolat din șapte probe, iar în serogrupul **E**, *S. Give* a fost identificată în 12 probe (50,00%), *S. London* în opt probe (33,33%), iar *S. Ruzizi* și *S. Sandiego* în două probe (8,33%); în ultimul serogrup, respectiv **G** a fost identificat un singur serovar, *S. Goldcoast*, izolat din două probe (100%).

Dorim să semnalăm, între serovarurile izolate, în mod special prezența serovarului Gloucester, identificat în prezentul studiu în trei probe, recoltate din pastă de mici și a serovarului Amherstiana, foarte rar izolat și în alte zone geografice, spre exemplu, Centrul de Combateră și Prevenție a Bolilor (CDC) din SUA raportează izolarea sa doar în două cazuri clinice de salmoneloză umană, declarate în perioada 2001-2011. În schimb, pentru *Salmonella* Litchfield, același centru specifică implicarea în 2203 cazuri patologice în perioada amintită.

Dintre serovarurile identificate, menționăm, alături de *Salmonella* Gloucester, și prezența unor serovaruri rare, precum, *Salmonella* Goldcoast și *Salmonella* Kottbus, care au fost înregistrate pentru prima dată în România, subliniind răspândirea sporadică a serovarurilor în țara noastră.

În urma testării prin tehnica ELISA a fost evidențiată prezența salmonelelor, certificată prin apariția culorii albastre în godeurile respective, în timp ce în cazul probelor negative culoarea godeurilor a rămas nemodificată. Decelarea salmonelelor prin testul VIDAS a fost motivată de necesitatea evidențierii rapide a acestor germeni, din anumite produse alimentare, deoarece prezența acestor bacterii, în patologia umană și animală, constituie o problemă majoră pentru sănătatea publică și sănătatea animală. Din aceste considerente în cadrul experimentelor din acest capitol s-a făcut o evaluare a performanțelor sistemului VIDAS SLM, comparativ cu metodele clasice standardizate.

Analizând rezultatele obținute putem afirma că testele imunoenzimatică (ELISA) și MiniVIDAS pot fi folosite cu succes, pentru punerea în evidență a prezenței/absenței salmonelelor în carne și preparate din carne, ca și metode alternative rapide, în mai puțin de 24 de ore, evitându-se astfel apariția unor toxinfecții alimentare la om. Sistemul Mini VIDAS este un sistem calitativ de detecție rapidă a bacteriilor, care utilizează tehnologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), ce are ca principiu de bază detecția antigenelor specifice prin tehnica imunoenzimatică de fluorescență.

Având în vedere principiul reacției VIDAS SLM, metoda prezintă o înaltă specificitate și se pretează a fi utilizată mai ales în cazul probelor cu grad ridicat de contaminare, cu floră de asociație, fapt ce îngreunează izolarea salmonelelor prin metodele clasice. Între rezultatele obținute prin metodele VIDAS SLM, ELISA și identificarea prin testele clasice a existat o concordanță de 100%.

Capitolul 8. Testarea susceptibilității antimicrobiene a izolatelor de *Salmonella* spp.

Obiectivul studiului

Cercetările au urmărit comportamentul unor tulpini de *Salmonella*, izolate din carne, proaspătă și tocată, semipreparate din carne, inclusiv pastă de mici, preparate de patiserie (tartă de fructe și prăjitură), coajă de ou, telemea și nutreț combinat la acțiunea unor substanțe antimicrobiene.

Materiale și metode

Cercetările privind susceptibilitatea unor tulpini bacteriene, aparținând genului *Salmonella*, izolate din probe de carne proaspătăși tocată, semipreparate, pastă de mici, produse de patiserie, telemea, nutreț combinat și coajă de ou, la unele substanțe antimicrobiene, s-a făcut prin metoda difuzimetrică, cu respectarea standardelor de referință CLSI și metoda microdiluțiilor. Pentru efectuarea experimentelor s-au testat 90 de tulpini de *Salmonella*, la zece substanțe antimicrobiene, după cum urmează: 30 de tulpini izolate din carne proaspătă și tocată, 40 din pastă de mici și 20 din telemea, nutreț combinat și coajă de ou.

Cercetările privind susceptibilitatea serovarurilor luate în studiu la substanțele antimicrobiene a fost efectuată și cu ajutorul sistemului de diluare microbroth Sensititre® (Trek Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH), în conformitate cu instrucțiunile producătorului și conform ghidului Organizației Internaționale pentru Standardizare [ISO 20776-1: 2007 (ISO, 2007)]. În cadrul acestei metode, pentru serovarurile de *Salmonella* a fost utilizată placa EUVSEC (Trek Diagnostics Systems, Inc.), iar pentru controlul calității a folosită tulpina *Escherichia coli* ATCC 25922.

Rezultate obținute

În urma analizei datelor obținute se poate observa că, indiferent de tipul probelor din care s-au izolat tulpinile de *Salmonella*, marea majoritate a acestora au fost sensibile la gentamicină, trimethoprim și claritromicină. Totuși, trebuie menționat faptul că numărul de tulpini sensibile la aceste substanțe microbiene a fost mai redus în cazul tulpinilor izolate din telemea, nutreț combinat și coajă de ou, comparativ cu cele izolate din carne proaspătă și tocată sau pastă de mici. Principalele substanțe antimicrobiene, față de care au manifestat rezistență tulpinile de *Salmonella*, indiferent de natura probei, au fost acidul nalidixic, furazolidonul și tetraciclina.

Menționăm că, nu s-a putut stabili o preponderență a tulpinilor rezistente, în funcție de tipul de probă, cele mai multe tulpini identificate în probele de carne proaspătă și tocată manifestând rezistență la ampicilin/ sulbactam (76,7%), cele izolate din pastă de mici la tetraciclina (72,5%) iar majoritatea tulpinilor izolate din telemea, nutreț combinat și de pe coajă de ou la furazolidon (80,0%).

În concluzie, putem afirma că profilul susceptibilității la substanțe antimicrobiene, a tulpinilor de *Salmonella* luate în studiu, demonstrează riscul asociat transmiterii microorganismelor multirezistente prin intermediul cărnii și a pastei de mici.

Analizând rezultatele obținute cu echipamentul Vitek 2 (*BioMérieux, Franța*), se constată, dependent de produsul din care au fost izolate salmonelele, o sensibilitate mai mare la tulpinile izolate din carne tocată, urmată de cele izolate din carne refrigerată și cârnați proaspeți.

Rezultatele obținute în urma testării unui număr mare de tulpini, izolate din carne și preparate din carne, cu sistemul Vitek 2, au evidențiat o sensibilitate ridicată la tigeciclină, cefotaxim, trimethoprim și gentamicină. Astfel, putem afirma că toate serovarurile luate în studiu au fost sensibile la trimethoprim, gentamicină și tigeciclină (100%), precum și la cefotaxim (80,0%).

Sensibilitatea antimicrobiană a fost maximă la serovarul *Salmonella* Virchow, izolat din carne de pasăre, sensibil la zece din cele 12 substanțe antimicrobiene (83,3%) și *Salmonella* Derby, izolat din carne tocată de porc, sensibil la opt din cele 12 substanțe antimicrobiene. Serovarul *Salmonella* Ruzizi, provenit dintr-o probă de carne proaspătă de porc, a fost sensibil la toate substanțele antimicrobiene luate în studiu. În schimb s-a constatat o rezistență deosebită la cele două serovaruri de *Salmonella* Infantis, izolate din carne de pasăre și pastă de mici, respectiv o rezistență semnificativă, la șapte din cele 12 substanțe antimicrobiene.

Sensibilitatea la substanțele antimicrobiene a serovarurilor de *Salmonella*, izolate din pastă de mici, a prezentat variații semnificative de la un serovar la altul. Astfel, în afara serovarurilor *Salmonella* Typhimurium și *Salmonella* Derbi, o rezistență semnificativă s-a constatat și la *Salmonella* Infantis, rezistentă la șapte dintre cele 12 substanțe luate în studiu, *Salmonella* Rissen, rezistentă la cinci dintre substanțele testate, iar *Salmonella* Give, *Salmonella* Gloucester și *Salmonella* Bredeney au fost rezistente la patru dintre substanțele testate.

Pe tip de produs s-a constatat o rezistență deosebită, înregistrată la serovarul *Salmonella* Kottbus, izolat din carne proaspătă de pasăre, serovar rezistent la opt din cele 12 substanțe antimicrobiene (66,7%), respectiv la *Salmonella* Gloucester, izolat din pastă de mici, rezistent tot la opt substanțe antimicrobiene.

Menționăm în mod deosebit și rezistența a trei serovaruri, testate la ciprofloxacina. Se pare că bacteriile devin rezistente la ciprofloxacina prin dezvoltarea de mutații în ARN-polimerază rezultând o enzimă incapabilă să lege antibioticul.

Capitolul 9. Caracterizarea moleculară a unor tulpini de *Salmonella* spp. izolate din produse de origine animală și non-animală prin tehnica reacției în lanț a polimerazei

Obiectivul studiului

Reacția polimerazică în lanț a devenit o alternativă rapidă la metodele tradiționale de clonare a ADN-ului. PCR este o metodă enzimatică care permite identificarea sau capturarea unei cantități foarte mici de acizi nucleici. Obiectivul principal a constat în confirmarea prezenței unor tulpini de *Salmonella*, de origine alimentară, cu ajutorul PCR.

Materiale și metode

Studiul a fost realizat în perioada februarie - mai 2020, pe un număr de zece tulpini de *Salmonella* izolate și caracterizate prin tehnici de diagnostic non-moleculare. În acest sens, din serogrupul de salmonele B, au fost alese randomic cinci tulpini de *Salmonella enterica* subspecia *enterica* serovarul Typhimurium, două tulpini de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Derby, iar din serogrupul C câte o tulpină de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Rissen, Infantis și Virchow.

Rezultate obținute

Pe baza analizei genei *invA*, la toate cele zece izolate, tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR) a dezvăluit dimensiuni ale fragmentelor amplificate, aproximativ 285 baze perechi. Mărimea acestor benzi, de o grosime consistentă și cu o strălucire evidentă, a confirmat faptul că organismele, caracterizate din punct de vedere genetic, aparțin genului *Salmonella* și că această genă e una ușor de amplificat.

Spre deosebire de alte norme de confirmare moleculară a unor tulpini de *Salmonella*, efectuate pe anumite gene ale ARN-ului dublu catenar prin transcriere internă a micro- și minisateliților care, în general, sunt considerați nefuncționali, gena *invA* este prezentă și la nivelul structurilor antigenice O, H și Vi fiind totodată cea mai importantă țintă pentru neutralizarea răspunsului imun prin anticorpi la oameni. De asemenea, gena *invA* este localizată la nivelul "insulei de patogenitate 1" a speciilor de *Salmonella* participând frecvent în procesul de invazie a celulelor epiteliale. Prin urmare, actualmente, gena *invA* este considerată cel mai polimorf și totodată cel mai identificabil marker molecular din genomul genului *Salmonella*.

În concluzie, se poate admite faptul că tehnica reacției în lanț a polimerazei, în care s-au utilizat amorse specifice pentru confirmarea genului *Salmonella*, poate fi considerată una cu o specificitate și sensibilitate crescută pentru acest scop.

Tehnica reacției în lanț a polimerazei utilizată pentru confirmarea moleculară a zece tulpini de *Salmonella* incluzând speciile *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Derby, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Rissen, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Infantis și *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarul Virchow a generat benzi de aproximativ 285 bp în toate cazurile.

Mărimea acestor benzi, de o grosime consistentă și cu o strălucire evidentă, a confirmat faptul că organismele, caracterizate din punct de vedere genetic, au aparținut genului *Salmonella* și că această genă e una ușor amplificabilă.

Rezultatele prezentului studiu au demonstrat faptul că metoda PCR, având ca target gena *invA*, s-a dovedit una simplă, rapidă, sigură și ușor reproductibilă, evidențiindu-se totodată specificitatea acestei gene și posibilitatea utilizării ei în cazul confirmării unor tulpini de *Salmonella*.

Ultima parte a tezei, include în **capitolul 10**, „Concluziile generale”, aspectele practice care se deduc din cercetările efectuate, recomandările pentru practicieni și relevarea aspectelor de noutate, dintre care menționăm:

- ✚ Izolarea și identificarea speciilor bacteriene, aparținând genului *Salmonella*, se realizează printr-o varietate de metode, standardizate, care pot apela sau nu la preîmbogățire și îmbogățire pentru resuscitarea bacteriilor cu viabilitate redusă.

- ✚ Mediile de îmbogățire, care conțin substanțe inhibitoare pentru germeii contaminați, precum și mediile selective și de diagnostic diferențial, permit decelarea salmonelelor în competiție cu alte bacterii enterice.

- ✚ Cultivarea pe medii de preîmbogățire și îmbogățire permite o mai mare specificitate și sensibilitate de detecție, în timp ce utilizarea mediilor neadecvate poate duce chiar la un eșec total și, implicit, la riscuri sporite pentru consumatori.

- ✚ Utilizarea concomitentă și comparativă a unei game variate de medii selective pentru izolarea salmonelelor a dovedit performanțele superioare ale mediului Rambach, un mediu cromogen, care asigură detectarea fără dubii a

tulpinilor de *Salmonella*, reducându-se semnificativ timpul și volumul de investigații, deziderat extrem de important pentru promptitudinea diagnosticului.

✚ Metodele convenționale de izolare și identificare, deși necesită un volum mare de muncă, iar rezultatele sunt uneori tardive pentru a putea lua decizii clinice și epidemiologice eficiente, rămân totuși de „referință” pentru toate celelalte sisteme de investigare a echipamentului exoenzimatic al salmonelelor.

✚ Galeriile API 20E au asigurat o caracterizare biochimică mai complexă a tulpinilor de *Salmonella* izolate și, prin urmare, un diagnostic mult mai sigur, mai ales în situațiile în care se constată o mare variabilitate în ceea ce privește calitatea diferitelor șarje de medii politrope utilizate.

✚ Carnea și produsele din carne cu cea mai mare frecvență a contaminării cu *Salmonella* spp. au avut origine aviară și suină, în timp ce probele de carne și produse din carne de origine bovină au fost caracterizate printr-o prezență mai redusă a *Salmonella* spp.

✚ Incidența serovarurilor identificate a fost variabilă de la un serogrup la altul, mai frecvent fiind identificate următoarele serovaruri: în grupul B, *Salmonella* Typhimurium (56,72%) și *Salmonella* Derby (17,91%), în grupul C, *Salmonella* Infantis (41,33%) și *Salmonella* Rissen (25,33%), în grupul D, *Salmonella* Enteritidis (100%), în grupul E, *Salmonella* GIVE (50,00%), iar în grupul G a fost identificat un singur serovar, *Salmonella* Goldcoast (100%).

✚ Dintre serovarurile identificate menționăm prezența unor serovaruri rare, precum *Salmonella* Gloucester, *Salmonella* Goldcoast și *Salmonella* Kottbus, care au fost înregistrate pentru prima dată în România, subliniind răspândirea sporadică a serovarurilor în țara noastră.

✚ Metodele rapide, ELISA și MiniVIDAS, pot fi folosite cu succes, ca și metode alternative, pentru punerea în evidență a prezenței/absenței salmonelelor în carne și preparate din carne, în mai puțin de 24 de ore, evitându-se apariția unor toxiinfecții alimentare la om.

✚ Profilul susceptibilității la substanțe antimicrobiene a tulpinilor de *Salmonella* luate în studiu, prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, demonstrează riscul asociat transmiterii microorganismelor multirezistente, prin intermediul cărnii și a pastei de mici.

✚ În urma testării unui număr mare de tulpini, cu sistemul Vitek 2, s-a evidențiat o sensibilitate ridicată la tigeicilină, cefotaxim, trimetoprim și gentamicină. Astfel, putem afirma că toate serovarurile luate în studiu au fost sensibile la trimetoprim, gentamicină și tigeicilină (100%), precum și la cefotaxim (80,0%).

✚ Sensibilitatea antimicrobiană a fost maximă la serovarul *Salmonella* Virchow, izolat din carne de pasăre, sensibil la zece din cele 12 substanțe antimicrobiene (83,3%) și *Salmonella* Derby, izolat din carne tocată de porc, sensibil la opt din cele 12 substanțe antimicrobiene.

✚ Rezultatele privind sensibilitatea antimicrobiană a serovarurilor izolate din pastă de mici relevă pericolul contaminării cu anumite serovaruri, la care fenomenul rezistenței antimicrobiene este prezent față de un număr relativ mare de substanțe antimicrobiene.

✚ Cea mai importantă corelație, din punct de vedere practic, a fost cea dintre comportamentul la substanțele antimicrobiene și originea tulpinilor, în sensul că serovarurile cele mai rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene au fost izolate din carne proaspătă, iar serovarurile cele mai sensibile din preparate din carne și carne tocată.

✚ Pe baza cercetărilor privind susceptibilitatea la unele substanțe antimicrobiene recomandăm implementarea unui sistem, cât mai judicios, de supraveghere și control a antibiorezistenței bacteriene, pe parcursul lanțului alimentar, bazat pe comunicarea între specialiștii de laborator, medicii epidemiologi și farmaciști.

✚ Rezultatele obținute în urma studiilor de biologie moleculară au demonstrat că metoda PCR, având ca target gena *invA*, este dovedit una simplă, rapidă, sigură și ușor reproductibilă, evidențiindu-se totodată specificitatea acestei gene și posibilitatea utilizării ei în cazul confirmării unor tulpini de *Salmonella*.

Metodele rapide, ELISA și MiniVIDAS, pot fi folosite cu succes ca și metode alternative pentru punerea în evidență a prezenței/absenței salmonelelor în carne și preparate din carne, în mai puțin de 24 de ore, evitându-se astfel apariția unor toxiinfecții alimentare la om.

✚ Profilul susceptibilității la substanțe antimicrobiene, a tulpinilor de *Salmonella* luate în studiu, prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, demonstrează riscul asociat transmiterii microorganismelor multirezistente, prin intermediul cărnii și a pastei de mici.

✚ În urma testării unui număr mare de tulpini, cu ajutorul sistemului Vitek 2, s-a evidențiat o sensibilitate ridicată la tigeciclină, cefotaxim, trimethoprim și gentamicină. Astfel, putem afirma că toate serovarurile luate în studiu au fost sensibile la trimethoprim, gentamicină și tigeciclină (100%), precum și la cefotaxim (80,0%)

✚ Sensibilitatea antimicrobiană a fost maximă la serovarul *S. Virchow*, izolat din carne de pasăre, sensibil la zece din cele 12 substanțe antimicrobiene (83,3%) și *S. Derby*, izolat din carne tocată de porc, sensibil la opt din cele 12 substanțe antimicrobiene.

✚ Rezultatele privind sensibilitatea antimicrobiană, a serovarurilor izolate din pastă de mici, relevă pericolul contaminării cu anumite serovaruri, la care fenomenul rezistenței antimicrobiene este prezent față de un număr relativ mare de substanțe antimicrobiene.

✚ Cea mai importantă corelație, din punct de vedere practic, a fost cea dintre comportamentul la substanțele antimicrobiene și originea tulpinilor, în sensul că serovarurile cele mai rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene au fost izolate din carne proaspătă, iar serovarurile cele mai sensibile din preparate din carne și carne tocată.

✚ Pe baza cercetărilor privind susceptibilitatea la unele substanțe antimicrobiene recomandăm implementarea unui sistem cât mai judicios de supraveghere și control a antibioretistenței bacteriene, pe parcursul lanțului alimentar, bazat pe comunicarea între specialiștii de laborator, medicii epidemiologi și farmaciști.

✚ Rezultatele obținute în urma studiilor de biologie moleculară au demonstrat că metoda PCR, având ca target gena *invA*, este dovedit una simplă, rapidă, sigură și ușor reproductibilă, evidențiindu-se totodată specificitatea acestei gene și posibilitatea utilizării ei în cazul confirmării unor tulpini de *Salmonella*.

PhD Thesis Summary

Research on the microbiological risk generated by the presence of *Salmonella* in food and feed

This thesis contains:

Abstracts in Romanian and English

Introduction

Part I - Bibliographic research: 40 pages

Part II - Own research: 93 pages

Tables: 40

Figures: 75

Bibliography sources: 295

List of published scientific papers

Purpose and objectives of the research

Bacteria belonging to the genus *Salmonella* cause a variety of clinical symptoms, from asymptomatic infections to typhoid-like syndromes in children or animals with high susceptibility. In adults, *Salmonella* is generally responsible for producing food poisoning.

For this reason, salmonellosis is considered specific zoonoses, with a universal spread, some strains being ubiquitous and others having a regional character. Currently, the World Health Organization (WHO) considers salmonellosis to be one of the most important diseases caused by eating contaminated food. Among the species of the genus, *Salmonella enterica* is incriminated as the most important cause of food poisoning with serious risks, in terms of human health, worldwide. Globally, it is estimated that non-typhoid *Salmonella* infections range from 200 million to 1.3 billion, with a mortality of about three million each year. For example, each year in the United States alone, 1.4 million people are infected with non-typhoid *Salmonella*, resulting in approximately 400 deaths.

Based on data reported by EU Member States, it can be seen that *Salmonella* are the microorganisms associated with the highest risk of food poisoning, being identified in a wide range of foods, of animal and non-animal origin, including feed. Also, meat and meat products are a category of food of major importance for triggering pathological phenomena.

The basic characteristic of *Salmonella* contamination is that there are no organoleptic changes to draw attention to the possible presence of germs, as the food has an unchanged appearance, color, smell and taste. With regard to the conditions of processing and storage of foodstuffs, it should be borne in mind that the minimum temperature for the development of *Salmonella* is 7°C, with refrigeration temperatures preventing them from multiplying but not destroying them. Under inadequate storage conditions, the time required for ten times the population of *Salmonella* to multiply is 24 hours at 15.6°C and only nine hours at 21°C.

For these reasons, bacteriological control of food, hygienic conditions in sales units, slaughterhouses and preparation plants, refrigerated storage of all potentially contaminated food, tightly packed transport, carefully controlled technological processing to avoid crossing raw materials with finished products and immediate consumption of heat-prepared foods are basic measures in the prophylaxis of food poisoning with *Salmonella spp.*

We mention that the very large dimensions of the episodes generated by industrially processed foods justify a permanent control of them even in seemingly risk-free circumstances. Isolation and identification of *Salmonella* from food involves great difficulties, as opposed to isolation from carcasses or pathological products. This, for the following two main reasons: food contamination with salmon coexists with another normal flora, which usually represents the competing flora, and is found in a much larger proportion. In most foods, which have undergone

various physical and chemical treatments, *Salmonella* are found in latent form, which is why their deceleration requires special conditions of investigation.

All these research directions have allowed the shaping of the present study, which has as general objective the study of *Salmonella* strains isolated from meat, meat preparations, including meat pasta, but also from confectionery, eggshell, cheese and combined fodder. Among the specific objectives of this study, we mention:

- isolation and identification of *Salmonella* from meat, meat preparations and meat pasta, but also from confectionery preparations, eggshell, cheese and combined fodder, with the help of classical, standardized bacteriological methods;
- study of the behavior of *Salmonella* on usual, standardized and selective media for enterobacteriaceae;
- study of the biochemical behavior of some *Salmonella* strains on multitest media, including with the help of the Api 20E system (BioMérieux, France);
- identification of *Salmonella* serogroups and serovars using classical (fast agglutination and slow agglutination) and modern, fast serological methods (ELISA, VIDAS);
- research on the behavior of some *Salmonella* serovars identified from samples collected from various foods of animal and non-animal origin, including compound feed, in relation to some antimicrobial substances;
- molecular characterization of *Salmonella* serovars isolated from meat and semi-prepared from meat by the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Part I

Current state of knowledge

It is extended on 40 pages (30.08% of the thesis), being structured on three chapters, which include 11 subchapters.

Chapter I. General considerations on the role of food in the occurrence of foodborne diseases in humans

It contains recent information on the role of food in the production of foodborne diseases and food poisoning in humans, following microbial contamination. At present, diseases resulting from the consumption of food of animal and non-animal origin have an important share in the field of public health, especially in the current European legislative context, in which in recent years there have been important changes both in terms of concerns the conditions for obtaining and marketing food.

Among the causes of the continuous emergence of food poisoning are: the phenomenon of globalization of food reserves and the introduction of pathogens in new geographical areas, exposure to risks related to hazardous food consumption (travel, refugees); changes in microorganisms, which may cause new pathogens, including the development of new virulent strains, the development of antibiotic resistance, adaptation to environmental conditions, changes in the human population (increased susceptibility to infections, aging population, malnutrition, etc.), lifestyle changes (consumption of fast food, consumption of food from street vendors), etc.

Given these aspects, the prevention and control of food poisoning includes complex measures, which aim at educating both food handlers to maintain proper hygiene in slaughterhouses, preparation and marketing, but also proper food preparation, proper refrigeration and prevention of contamination cross-breeding, pasteurization of milk, personal hygiene measures and reduction of carcass contamination in slaughterhouses.

At present, it is unanimously accepted that most cases of food poisoning have as main etiological agent various bacterial species belonging to the genus *Salmonella*. Based on data reported by EC Member States, it can be seen that *Salmonella* is the microorganism associated with the highest risk of food poisoning. Among the foods we can mention, as main source, meat and meat products, milk and dairy products, fish and fish products, eggs and egg products, including fruits and vegetables, and among animals laying hens, on the next place in importance ranking - turkeys, ducks and geese followed by pigs and cattle.

Chapter 2. General characteristics of the genus *Salmonella*

It includes "up-to-date" information on the taxonomic classification of *Enterobacteriaceae* in general and species belonging to the genus *Salmonella* in particular, aspects of ecology and epidemiology, main morpho-cultural and biochemical characteristics, structure antigenic, resistance to environmental factors and antimicrobial substances, as well as aspects of pathogenesis and natural infection.

The taxonomy and nomenclature of *Enterobacteriaceae* is still a very topical issue, although, over time, many attempts have been made to systematize. According to data from the literature there are numerous approaches to the taxonomy and structuring of bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae*.

Currently, in order to avoid the confusion caused by the frequent taxonomic changes within the genus *Salmonella*, current taxonomists suggest keeping the nomenclature proposed by the WHO International Center-Paris which is applied in veterinary medical and medical practice and in our country. Thus, according to the CDC system, the genus *Salmonella* includes two species, *Salmonella enterica*, type species and *Salmonella bongori*. To these, on March 18, 2005, a new species was added, *Salmonella subteranea*, isolated and identified by Shelobolina et al., and published in the validation list.

In the subchapter "Ecology and epidemiology of *Salmonella*", the main niches and vectors are identified, with major importance in the occurrence of food poisoning. Among these factors, food and feed play a dominant role, and the environment and vectors have a central position that explains the increase in diffusion in food and feed. The human factor, as a primary source, also plays a modest contaminating role in food and feed.

Epidemiologically, Jay et al. propose the following classification of *Salmonella*: *Salmonella* that infect only humans: *S. typhi* and *S. paratyphi* (typhoid and paratyphoid fever agents); host specific salmon: *S. abortus-equi*(horses), *S. abortus-ovis* (sheep), *S. cholerae-suis* (pigs), *S. dublin* (calves) and *S. gallinarum* (birds), some of them pathogenic and human; un adapted *Salmonella* (without host preference), pathogenic to both humans and animals.

Also, in this chapter are described the main morphological, cultural, biochemical and antigenic aspects of species classified in the genus *Salmonella*. We mention in particular the biochemical characters, extremely important elements in the identification and classification of *Salmonella*, but also of the antigenic structure, with a decisive role in specifying *Salmonella* serogroups and serovars.

The resistance of salmonella to physico-chemical factors, includes a review of the most important environmental factors that condition the microbial activity of *Salmonella*, causing either growth and reproduction stimulation or inhibition of activity (inactivation of microorganisms).

The behavior of *Salmonella* against antimicrobials is a synthesis of current knowledge on sensitivity to species of the genus *Salmonella*. The data presented are extremely important in the context in which the phenotypic and genotypic resistance, encountered in some *Salmonella* serovars, isolated from animals, are not similar to those isolated from meat from the slaughter stream. A large number of studies in recent years have shown phenotypic antimicrobial resistance in *Salmonella* serotypes isolated from food.

The subchapter "Elements of pathogenesis" contains recent information demonstrating the aggressive abilities of *Salmonella* through both recognized pathogenicity mechanisms in bacteria: virulence and toxicity.

Chapter 3. Methods of isolation and identification of *Salmonella*

Here are presented the most commonly used methods of diagnosis of *Salmonella*. The diagnosis of *Salmonella* is part of the general methodology of isolating the etiological agent from the patient and the incriminated food. Thus, in this study, are presented both conventional systems, using simple determination schemes, or more complex schemes, used by clinical microbiology laboratories, and multitest systems, which use several identification elements, but also microtest systems.

Part II. Own research

This part extends to 93 pages (69.92% of the thesis) and includes six large chapters, to which are added the general conclusions.

Chapter 4. The objective of the study

At present, a large number of detection methods are used to isolate and identify *Salmonella*, many of which are commercially available. *Salmonella* screening tests range from complex procedures, which include laborious techniques (thin-layer agar method or immunological separation), to simple, lateral flow tests incorporated into immunochromatographic technology. To date, more than thirty alternative methods of detecting *Salmonella* have been validated, most of them being enzyme-linked immunosorbent assays or molecular biology tests. Pre-enriched samples can be analyzed directly by enzyme-linked immunosorbent assay or after a short boiling step, the methods can be automated, thus improving the effectiveness of the tests and reducing human error.

Given the aspects mentioned above, the main objective of our research was to evaluate methods for isolating and identifying bacteria of the genus *Salmonella*, from various samples, taken from products of animal and non-animal origin.

In order to achieve the main objective of the research in this chapter, several specific objectives were considered, among which we mention: isolation and identification of *Salmonella* from samples taken from products of animal and non-animal origin, using classical, standardized bacteriological methods; research on the behavior of *Salmonella* on selective media for *Enterobacteriaceae*; research on the biochemical behavior of some *Salmonella* strains on multitest media, as well as with the help of the Api 20E system (BioMérieux, France); identification of *Salmonella* serogroups and serovars using classical (fast and slow agglutination) and fast (ELISA, VIDAS) serological methods; research on the behavior of *Salmonella* serovars identified against some antimicrobial substances, both by the diffusimetric method and with the help of the Vitek-2 system; molecular characterization of isolated *Salmonella* strains from meat and meat semi-finished products by the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Chapter 5. Investigations on the isolation of *Salmonella* from food by classical

Materials and methods

The research was carried out over five years, between 2016 and 2020, taking into account a number of 4707 samples, represented by poultry, pork and beef (raw and minced), meat pasta, meat preparations pork (sausages, kaizer), beef cheese, pastries (fruit tart, cakes), eggshell and compound feed, from processing and marketing units in two counties in the south of the country.

The units from which the samples were collected were the following: a red meat slaughterhouse, a poultry slaughterhouse, butchers, specialized units for obtaining meat and meat preparations, sales units (supermarkets, confectioneries, grocery stores). neighborhood) etc. The samples of chilled and minced meat came from three species (poultry, pork, beef), while the samples of prepared meat came only from pork and beef, including mixed meat.

The samples collected and individualized, by serial number, were sealed to exclude the spread of germs in the environment and shipped quickly to the laboratory, where they were subjected to bacteriological investigations aimed at isolating, identifying and serotyping the germs, according to current standards. Thus, the samples taken were analyzed, using the methodology provided in SR EN ISO 6579/2003 AC/2006 (Association for Romanian Standards, 2003), as well as SR EN ISO 10272/2006 (Association for Romanian Standards, 2006).

In the experiments we used standardized examination methods, first of all, the classic bacteriological examinations (bacterioscopic examinations, cultivation, isolation and identification of *Salmonella*) from poultry, pork and beef (raw and minced), meat pasta, meat preparations pork (sausages, kaizer), beef tenderloin, pastries (fruit tart, cakes), eggshell and compound feed.

Results

Even today, classical bacteriological methods ensure, in addition to isolating bacteria, the identification of different morphological and cultural characteristics on the basis of which the strains can be classified into species and genera. In addition, bacteriological examination provides clues as to the source of infection, making it possible to eliminate it.

Laboratory experiments have shown that all enterobacteriaceae have the property of being Gram-negative, have medium size, like many other bacteria of other genera and families, however direct microscopy is not usually useful in identifying *Salmonella*. However, following the examination of the cultures, obtained following the inoculation from the samples to be researched, germs of bacillary and cocobacillare form were detected, with dimensions

between 2-4/0.5-0.7 μm , Gram negative, un-capsulated, un-sporulated, but ciliated, which may be in the *Salmonella* group.

Laboratory tests, aimed at decelerating *Salmonella* from the samples under study, were performed according to the international standardized reference method (EN ISO 6579), with the mandatory completion of pre-enrichment and enrichment steps, prior to *Salmonella* isolation.

The concomitant and comparative use of a wide range of specific environments for the isolation of *Salmonella* has proven the superior performance of the Rambach environment, a chromogenes environment, which ensures the undoubted detection of *Salmonella* strains, which greatly reduced the time and volume of investigations, extremely important for the promptness of the diagnosis so necessary for the detection and prevention of human and animal episodes of salmonellosis.

The success of high-rate isolation of *Salmonella* has been greatly influenced by the use of classical diagnostic schemes with the choice of appropriate media and the correct and accurate execution of working techniques, as well as the type and quality of the pathological material examined.

In conclusion, we can say that conventional methods of isolation and identification, although they require a large amount of work, and the results are sometimes late to make effective clinical and epidemiological decisions, still remain a "reference" for all other systems of investigation of exoenzymatic equipment of *Salmonella*.

Chapter 6. Research on the biochemical behavior of *Salmonella* spp. Strains, isolated from animal and non-animal products

The research aimed at classifying bacterial strains, whose behavior, bacterioscopically and bacteriologically, did not allow the inclusion in specific characteristics of bacteria of the genus *Salmonella* by studying germ mobility, the biochemical characteristics of sugar fermentation and the use of citrate as the only carbon source.

Materials and methods

For the research were used colonies transplanted from bacterial cultures, obtained on selective isolation media and suspected as belonging to the genus *Salmonella*, which, in a first stage, were transplanted on nutrient agar, and later on selective media to highlight biochemical characteristics. Within the working methodology, the identification of *Enterobacteriaceae* in general, and of species belonging to the genus *Salmonella* in particular, by conventional biochemical tests, on differential diagnostic sets, is the method to which all other modern methods of identification refer.

In the research, from all meat samples, semi-prepared meat, including meat pasta, telemea, confectionery, eggshell and compound feed, investigated during the study period, between 2016-2020, the strains isolated and included in -a first stage in the group of *Salmonella*, in number of 175 strains, included in a first stage in the group of *Salmonella*, were subjected to laboratory examinations to highlight the biochemical characteristics in order to confirm and classify them in the genus. For this purpose, following the initial isolation, the colonies with morphological and cultural characteristics, typical for species of the genus *Salmonella*, were also studied in terms of metabolic equipment, by passing on polytrophic media (multitest culture media) or, as needed, and on individual tests as well as on microtest systems (eg. Api 20 E).

The accuracy of the work performed was confirmed by the national reference laboratory, within the Institute of Diagnosis and Animal Health and I.N.C.D.M.I. Cantacuzino, where the definite diagnosis is ensured by biochemical typing, bacteriokinotype and lysotype, for strains of special epidemiological interest.

Results

The analysis of the results found, in terms of behavior on the *TSI medium*, a typical reaction for *Salmonella* in the *TSI medium*. However, many researchers claim that *S. choleraesuis* does not produce H_2S , although the *S. choleraesuis* Kunzendorf biotype is H_2S positive, and the pretentious *S. typhi suis* is variable in H_2S production.

In our experiments, when examining the seeded tubes, the *Salmonella* spp. Strains studied had the following biochemical behavior: all 175 strains fermented glucose, causing the color of the medium column to turn red, instead only 139 (78.53 %), out of a total of 175 isolated strains, produced H_2S , a reaction visible by blackening of the medium in the right portion and the inclined portion, compared to *E. coli* in which the color remained unchanged.

In the *MIU medium*, *Salmonella* strains, isolated from seeding on selective media, had a positive reaction to the decomposition of urea, the color of the medium turning yellow, and a negative reaction to the production of iodole, highlighted by the absence of red ring formation on the surface, which is present in the cultivation of *E. coli*. We mention that, out of the 175 *Salmonella* strains studied, the presence of mobility was not found in 15 strains, although all 15 strains produced H_2S , following inoculation on the *TSI medium*.

The SIM medium was used, together with the TSI and MIU media, for the biochemical identification of *Salmonella* strains isolated on selective media, highlighting the production of hydrogen sulfide, by blackening the entire column of the medium to 32 *Salmonella* strains to which the reaction was negative on the TSI environment.

With the help of *microtest systems*, following the experiments, out of the 4707 samples were isolated, identified and confirmed by laboratory tests, 175 strains belonging to the genus *Salmonella*.

Analyzing the results obtained after examining the 175 strains, belonging to the genus *Salmonella*, we find a different frequency from one year to another, but with an upward trend until 2019, when most positive samples for *Salmonella* were detected. It should be noted that in the EU countries, the EFSA report from 2018 showed a reduction in the incidence of *Salmonella* in food products, starting with 2014, so that, in 2018, to return to values close to those recorded in 2014.

Depending on the nature of the samples analyzed, it can be seen that the largest share was held by *Salmonella* strains isolated from meat pasta, respectively 58 strains (15.26% of the total of 175 strains) followed by minced pork, 26 strains (4.68%), chicken breast, 14 strains (5.91%), fresh poultry, ten strains, and minced beef, also ten strains (2.58%).

Among the animal species, from which most of the positive samples came, it can be stated that pigs are the main incriminated species, followed by poultry and cattle. In the case of samples collected from eggshell, cheese, pastries and compound feed, most *Salmonella* strains were isolated from eggshell, seven strains (3.13%), then six strains from cheese and combined fodder (2.87 and 4.48%, respectively).

At the opposite pole are the samples collected from fresh beef and pork neck, of which only one *Salmonella* strain was identified, respectively 0.69% of the total samples analyzed (145 samples collected from fresh beef and also 145 samples pork neck), corresponding to a prevalence of 1.48%, based on the number of samples of this type analyzed, and 0.2%, based on the total number of samples studied.

In conclusion, we can state that out of the total number of 4707 samples taken and examined, 175 *Salmonella* strains (3.72%) were isolated and identified, based on bacterioscopic, cultural and biochemical behavior, results confirmed later by serological tests. API 20 E galleries provided a much more complex biochemical characterization of isolated *Salmonella* strains (20 biochemical properties) and therefore a much safer diagnosis, especially in situations where greater variability in regarding the quality of the different batches of polytrope media used.

Chapter 7. Research on the identification of *Salmonella* serogroups and serovars

The objective of the study

The main objective was to classify *Salmonella* strains isolated from meat samples, meat semi - finished products, cheese, eggshells, confectionery and compound feed into serogroups and serovars. Within the specific objectives, both the serotyping of the strains by classical methods (agglutination tests, fast and slow), and an evaluation of the rapid detection methods of *Salmonella* spp.

Materials and methods

As it is known, for the serological identification of the main serovars, classified in the genus *Salmonella*, and their differentiation from the other *Enterobacteriaceae*, three types of antigens are important, respectively somatic antigens (O), flagellar antigens (H), present in all *Salmonella* serovariants. (except *S. pullorum* and *S. gallinarum*, which are immobile) and other *Enterobacteriaceae* and sheath antigens (Vi), (present only in *S. typhi*). Thus, in the practice of antigenic identification, the “O” factors are initially determined by rapid agglutination reactions on the slide, which allow the inclusion in a serological group, then, inside the group, we identify the “H” type factors by the Kauffmann White seroagglutination method.

For classical serological reactions, anti-*Salmonella* sera containing specific antibodies (agglutinins) were used for each serum group O, H and Vi, being used in practice for the determination of *Salmonella* serotypes by the seroagglutination reaction on the slide and slow agglutination in microplates. Anti-*Salmonella* sera, produced by S.C., were used to perform classical serological tests. Sanimed International Impex S.R.L. and Pro-Lab Diagnostics Canada. In these experiments, we also proposed an evaluation of the rapid methods for detecting strains of *Salmonella* spp. combined, previously enriched in buffered peptone water, using both a qualitative enzyme-linked immunosorbent assay and the VIDAS test.

We mention that the VIDAS *Salmonella* system, validated in 1994 by AFNOR (French Association for Standardization), according to the reference method described in the international standard ISO 6579, is a fast method of analysis for all foodstuffs intended for human or animal consumption. The miniVIDAS automated test uses ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) technology and is based on the detection of *Salmonella* spp. Antigens, potentially present in meat samples, meat preparations and sanitation tests, by the fluorescent immunoenzymatic technique.

Results

From the samples taken, a number of 175 *Salmonella* strains were subjected to the study, using agglutination reactions. Following the tests, out of the 175 strains, 89 strains (50.86%) were included in serological group B, 60 strains (34.09%) belonged to serological group C, 7 strains (4.00%) were classified in group D, 17 strains (9.71%) in group E and two strains (1.14%) were classified in group G.

The 175 strains of *Salmonella* spp. Isolated from meat (fresh and minced), meat semi-finished products, pastries (fruit tart, cake), eggshell and compound feed belonged to a number of 20 serovars distributed as follows: five serovars in serogroup B, nine serovars in serogroup C, one serovar in serogroup D, four serovars in serogroup E and one serovar in serogroup G.

Compared to the total number of isolated and identified *Salmonella* spp. Strains (n = 175), the incidence of serovars determined by serological tests was variable from one serogroup to another. Thus, in serogroup B the most frequently identified serovars were *S. Typhimurium* (56.72%), *S. Derby* (17.91%) and *S. Bredeney* (16.42%) while *Salmonella* Brandenburg and Gloucester were isolated only from three samples (4.48%); In group C, *S. Infantis* (41.33%), *S. Rissen* (25.33%) and *S. Virchow* (14.67%) were the most frequently isolated serovars, followed by *S. Mbandaka* (6.67%), *S. Kottbus* (5.33%) and *S. Newport* (2.67%) while serovars *S. Amherstiana*, *S. Djugu* and *S. Litchfield* were isolated from only one sample (1.33%); In serogroup D, a safe serovar was included, namely *S. Enteritidis*, isolated from seven samples, and in serogroup E, *S. Give* was identified in 12 samples (50.00%), *S. London* in eight samples (33.33%), and *S. Ruzizi* and *S. Sandiego* in two samples (8.33%); In the last serogroup, respectively G, a single serovar was identified, *S. Goldcoast*, isolated from two samples (100%).

We would like to point out, among the isolated serovars, in particular the presence of the Gloucester serovar, identified in the present study in three samples, collected from meat paste, the Amherstiana serovar, very rarely isolated in other geographical areas, for example, the Center for Combat and Prevention Diseases (CDC) in the US report its isolation in only two clinical cases of human salmonellosis reported between 2001-2011. In contrast, for *Salmonella* Litchfield, the same center specifies involvement in 2203 pathological cases during the mentioned period.

Among the identified serovars, we mention, along with *S. Gloucester*, the presence of rare serovars, such as *S. Goldcoast* and *S. Kottbus*, which were registered for the first time in Romania, emphasizing the sporadic spread of serovars in our country.

Following the ELISA test, the presence of *Salmonella* was highlighted, certified by the appearance of blue in the respective wells, while in the case of negative samples the color of the wells remained unchanged. The detection of *Salmonella* by the VIDAS test was motivated by the need for rapid detection of these germs in certain foods, because the presence of these bacteria in human and animal pathology is a major problem for public and animal health. For these reasons, in the experiments in this chapter, an evaluation of the performance of the VIDAS SLM system was made, compared to the standardized classical methods.

In conclusion, we can say that enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and MiniVIDAS can be used successfully to detect the presence / absence of *Salmonella* in meat and meat preparations, as well as rapid alternative methods, in less than 24 hours, avoiding thus the appearance of food poisoning in humans. The Mini VIDAS system is a qualitative system for rapid detection of bacteria, which uses ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technology, which has as a basic principle the detection of specific antigens by the fluorescent enzyme immunoassay technique.

Given the principle of the VIDAS SLM reaction, the method has a high specificity and is suitable for use, especially in the case of samples with a high degree of contamination with association flora, which makes it difficult to isolate *Salmonella* by classical methods. There was a 100% concordance between the results obtained by VIDAS SLM, ELISA and identification by classical tests.

Chapter 8. Testing of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp.

The objective of the study

The research observed the behavior of some *Salmonella* strains, isolated from meat, fresh and minced, semi-prepared meat, including meat pasta, pastries (fruit tart and cake), eggshell, cheese and fodder combined, to the action of some antimicrobial substances.

Materials and methods

Research on the susceptibility of bacterial strains, belonging to the genus *Salmonella*, isolated from samples of fresh and minced meat, semi-prepared, meat pasta, pastries, cheese, compound feed and eggshell, to some antimicrobial substances was done by diffusion method, with compliance with CLSI reference standards and the microdilution method. For the experiments, 90 strains of *Salmonella* were tested on ten antimicrobial substances, as

follows: 30 strains isolated from fresh and minced meat, 40 from meat pasta and 20 from cheese, compound fodder and eggshell.

Research on the susceptibility of serovars under study to antimicrobials was also performed using the Sensititre® microbroth dilution system (Trek Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH), in accordance with the manufacturer's instructions and the International Organization for Standardization's guide [ISO 20776 -1: 2007 (ISO, 2007)]. In this method, the EUVSEC plate (Trek Diagnostics Systems, Inc.) was used for *Salmonella* serovars, and the *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was used for quality control.

Results

From the analysis of the data obtained, it can be seen that, regardless of the type of samples from which the *Salmonella* strains were isolated, the vast majority of them were sensitive to gentamicin, trimethoprim and clarithromycin. However, it should be noted that the number of strains sensitive to these microbial substances was lower in the case of strains isolated from cheese, compound fodder and eggshell, compared to those isolated from fresh and minced meat or meat pasta. The main antimicrobials, which *Salmonella* strains were resistant to, regardless of the nature of the sample, were nalidixic acid, furazolidone and tetracycline.

We note that it was not possible to establish a preponderance of resistant strains, depending on the type of sample, most strains identified in fresh and minced meat samples showing resistance to ampicillin/sulbactam (76.7%), those isolated from meat paste to tetracycline (72.5%), and most strains isolated from cheese, compound fodder and eggshell to furazolidone (80.0%).

In conclusion, we can say that the susceptibility profile to antimicrobial substances, of the *Salmonella* strains studied, demonstrates the risk associated with the transmission of multidrug-resistant microorganisms, through meat and meat pasta.

Analyzing the results obtained with the help of Vitek 2 equipment (BioMérieux, France), it is found, depending on the product from which the *Salmonella* were isolated, a higher sensitivity to isolated strains of minced meat, followed by those isolated from chilled meat and fresh sausages.

The results of testing a large number of strains, isolated from meat and meat preparations, using the Vitek 2 system, showed a high sensitivity to tigecycline, cefotaxime, trimethoprim and gentamicin. Thus, we can state that all serovars studied were sensitive to trimethoprim, gentamicin and tigecycline (100%), as well as to cefotaxime (80.0%).

Antimicrobial susceptibility was highest in *S. Virchow* serovar, isolated from poultry, sensitive to ten of the 12 antimicrobial substances (83.3%) and *S. Derby*, isolated from minced pork, sensitive to eight of the 12 substances antimicrobials. Serovar *S. Ruzizi*, from a sample of fresh pork, was sensitive to all antimicrobials studied. Instead, a special resistance was found to the two *S. Infantis* serovars, isolated from poultry meat and meat pasta, respectively a significant resistance, to seven of the 12 antimicrobial substances.

The antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serovars, isolated from meat paste, showed significant variations from one serovar to another. Thus, in addition to the *S. Typhimurium* and *S. Derby* serovars, a significant resistance was found in *S. Infantis*, resistant to seven of the 12 substances studied, *S. Rissen*, resistant to five of the substances tested, and *S. Give*, *S. Gloucester* and *S. Bredeney* were resistant to four of the substances tested.

By product type, a special resistance was found, recorded in *S. Kottbus* serovar, isolated from fresh poultry meat, serovar resistant to eight of the 12 antimicrobial substances (66.7%), respectively in *S. Gloucester*, isolated from small, also resistant to eight antimicrobial substances.

We also mention in particular the resistance of three serovars tested to ciprofloxacin. Bacteria appear to become resistant to ciprofloxacin by developing mutations in RNA polymerase resulting in an enzyme unable to bind the antibiotic.

Chapter 9. Molecular characterization of strains of *Salmonella* spp. isolated from products of animal and non-animal origin by polymerase chain reaction technique

The objective of the study

The polymerase chain reaction has become a rapid alternative to traditional DNA cloning methods. PCR is an enzymatic method that allows the identification or capture of a very small amount of nucleic acids. The main objective was to confirm the presence of food-borne *Salmonella* strains using PCR.

Materials and methods

The study was conducted between February and May 2020, on a number of ten *Salmonella* strains isolated and characterized by non-molecular diagnostic techniques. In this sense, from the serogroup of B *Salmonella*, five strains of *S. enterica* subsp. *enterica* were selected randomly from the serovar Typhimurium, two strains of *S. enterica*

subsp. *enterica* serovar Derby, and from serogroup C a strain of *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen, Infantis and Virchow.

Results

Based on *invA* gene analysis, in all ten isolates, the polymerase chain reaction (PCR) technique revealed amplified fragment sizes, approximately 285 base pairs. The size of these bands, of a consistent thickness and with an obvious brightness, confirmed the fact that the organisms, characterized from a genetic point of view, belong to the genus *Salmonella* and that this gene is an easy one to amplify.

Unlike other molecular confirmation norms of some *Salmonella* strains, performed on certain double-stranded RNA genes by internal transcription of micro- and mini-satellites that are generally considered non-functional, the *invA* gene is also present in antigenic structures. O, H and Vi are also the most important target for neutralizing the immune response through antibodies in humans. Also, the *invA* gene is located at the level of the "island of pathogenicity 1" of *Salmonella* species, frequently participating in the invasion process of epithelial cells. Therefore, currently, the *invA* gene is considered the most polymorphic and also the most identifiable molecular marker in the genome of the *Salmonella* genus.

In conclusion, it can be admitted that the polymerase chain reaction technique, in which specific primers were used to confirm the genus *Salmonella*, can be considered one with increased specificity and sensitivity for this purpose.

Polymerase chain reaction technique used for molecular confirmation of ten *Salmonella* strains including *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Derby, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Virchow generated bands of approximately 285 bp in all cases.

The size of these bands, of a consistent thickness and with an obvious brightness, confirmed the fact that the organisms, genetically characterized, belonged to the genus *Salmonella* and that this gene is an easily amplifiable one.

The results of the present study demonstrated that the PCR method, targeting the *invA* gene, proved to be a simple, fast, safe and easily reproducible, while highlighting the specificity of this gene and the possibility of using it to confirm *Salmonella* strains.

Chapter 10. General conclusions

Here are presented the practical aspects that can be deduced from the research carried out, the recommendations for practitioners and the revelation of the novelty aspects, among which we mention:

- ✚ The isolation and identification of bacterial species, belonging to the genus *Salmonella*, is achieved by a variety of standardized methods, which may or may not resort to pre-enrichment and enrichment for the resuscitation of bacteria with reduced viability.

- ✚ Enrichment media, which contain contaminants for contaminated germs, as well as selective and differential diagnostic media, allow the detection of *Salmonella* in competition with other enteric bacteria.

- ✚ Cultivation on pre-enrichment and enrichment media allows greater specificity and sensitivity of detection, while the use of unsuitable media can even lead to a total failure and, implicitly, to increased risks for consumers.

- ✚ The concomitant and comparative use of a wide range of selective media for the isolation of *Salmonella* has proven the superior performance of the Rambach environment, a chromogenes environment, which ensures the undoubted detection of *Salmonella* strains, significantly reducing the time and volume of investigations for prompt diagnosis.

- ✚ Conventional isolation and identification methods, although it requires hard labour and sometimes delayed in order to make effective clinical and epidemiological decisions, remain a "reference" for all other *Salmonella* exoenzymatic equipment investigation systems.

- ✚ API 20 galleries have provided a more complex biochemical characterization of isolated *Salmonella* strains and therefore a much safer diagnosis, especially in situations where there is great variability in the quality of the different batches of polytrophic media used.

- ✚ Meat and meat products with the highest frequency of *Salmonella* spp. contamination were of avian and porcine origin, while samples of beef and beef products were characterized by a lower presence of *Salmonella* spp.

- ✚ The incidence of the identified serovars was variable from one serogroup to another, more frequently being identified the following serovars: in group B, *S. Typhimurium* (56.72%) and *S. Derby* (17.91%), in group C, *S.*

Infantis (41,33%) and *S. Rissen* (25.33%), in group D, *S. Enteritidis* (100%), in group E, *S. Give* (50.00%), and in group G only one serovar was identified, *S. Goldcoast* (100%).

Among the identified serovars we mention the presence of rare serovars, such as *S. Gloucester*, *S. Goldcoast* and *S. Kottbus*, which were registered for the first time in Romania, emphasizing the sporadic spread of serotypes in our country.

Rapid methods, ELISA and MiniVIDAS, can be successfully used as alternative methods to detect the presence / absence of *Salmonella* in meat and meat preparations in less than 24 hours, thus avoiding the occurrence of food poisoning in humans.

The susceptibility profile to antimicrobials, of the *Salmonella* strains studied, by the Kirby-Bauer disc-diffusimetric method, demonstrates the risk associated with the transmission of multidrug-resistant microorganisms, through meat and meat paste.

After testing a large number of strains, with the help of the Vitek 2 system, a high sensitivity to tigecycline, cefotaxime, trimethoprim and gentamicin was shown. Thus, we can state that all serovars studied were sensitive to trimethoprim, gentamicin and tigecycline (100%), as well as to cefotaxime (80.0%).

Antimicrobial susceptibility was highest in *S. Virchow* serovar, isolated from poultry, sensitive to ten of the 12 antimicrobial substances (83.3%) and *S. Derby*, isolated from minced pork, sensitive to eight of the 12 substances antimicrobials.

The results regarding the antimicrobial sensitivity of the serovars isolated from meat paste, reveal the danger of contamination with certain serovars, in which the phenomenon of antimicrobial resistance is present compared to a relatively large number of antimicrobial substances.

The most important correlation, from a practical point of view, was that between the behavior of antimicrobials and the origin of the strains, in the sense that the serovars most resistant to the action of antimicrobials were isolated from fresh meat and the most sensitive serovars from meat preparations. and minced meat.

Based on research on susceptibility to some antimicrobial substances, we recommend the implementation of a more judicious system of surveillance and control of bacterial antibiotic resistance during the food chain, based on communication between laboratory specialists, epidemiologists and pharmacists.

The results obtained from molecular biology studies showed that the PCR method, targeting the *invA* gene, is a simple, fast, safe and easily reproducible, while highlighting the specificity of this gene and the possibility of its use in case of confirmation of *Salmonella* strains.