
SALMONELLA SPP. CONTAMINATION IN JAPANESE QUAIL (*COTURNIX JAPONICA*) EGGS

Srdan Tasić

Academy of Applied Technical and Preschool Studies, Niš, Serbia, srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs

Abstract: In the human diet, Japanese quail eggs are used in raw condition. A salmonellosis pandemic can be explained based on the fact that *Salmonella* has the ability to contaminate eggs without causing visual signs of a disease among infected birds. Agricultural households in Serbia often do not satisfy necessary sanitary standards for quail raising. The main sources of bacterial contamination are infected food, bad hygiene and storage of eggs in inadequate conditions. The subject of investigation were 48 seven-day-old Japanese quail eggs coming from one individual household. The presence of *Salmonella* was investigated both in the inside of the egg as well as on the shell. Isolation was based on standard bacteriological methods. Biochemical identification was performed using the commercial API 20 E system, and 6704752 profile was obtained. The Apilabplus V 3.3.3 bioMérieux software revealed 99.9% identity (*Salmonella spp.*). Positive biochemical tests were: arginine dihydrolase (ADH), lysine decarboxylase (LDH), ornithine decarboxylase (ODC), citrate utilization (CIT), H₂S production (H₂S), glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), melibiose (MEL), arabinose (ARA). Negative biochemical tests were: β-galactosidase (ONPG), urease (URE), tryptophane deaminase (TDA), indole production (IND), acetoin production (VP), gelatin hydrolysis (GEL), sucrose (SUC), amygdalin (AMY), oxidase (OX). The presence of *Salmonella spp.* could be confirmed in 6 out of 48 swabs taken from the egg shells. Additional tests confirmed *Salmonella enteritidis* in all six samples. The contamination with enterobacteria could not be confirmed in the inside of the sampled eggs. Given the confirmed presence of salmonella on the surface of the Japanese quail eggs, continuous bacteriological control of the eggs as well as the water, the food and the conditions of the quails' living environment on the farms would be in the interest of salmonellosis prevention beside vaccination.

Keywords: salmonella spp., Japanese quail eggs

JAJA JAPANSKE PREPELICE (*COTURNIX JAPONICA*) - KONTAMINACIJA *SALMONELLA SPP.*

Srdan Tasić

Akademija tehničko-vaspitačkih strukovnih studija, Niš, Srbija, srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs

Rezime: Jaja japanske prepelice se u ishrani često koriste i u sirovom stanju. Pandemija salmoneloze se objašnjava činjenicom da *Salmonella* ima sposobnost da kontaminira jaja bez izazivanja vidljivih znakova bolesti kod zaraženih ptica. Poljoprivredna domaćinstva u Srbiji često ne zadovoljavaju neophodne sanitarne standarde za gajenje prepelice. Glavni izvori bakterijske kontaminacije su zaražena hrana, nepravilan higijenski smeštaj i čuvanje jaja u neadekvatnim uslovima. Predmet ispitivanja bila su 48 jaja japanske prepelice starosti sedam dana poreklom iz individualnog domaćinstva. Ispitivano je prisustvo *Salmonella* kako u unutrašnjosti jajeta tako i na površini ljuske. Za izolaciju korišćene su standardne bakteriološke metode. Biohemijska karakterizacija urađena je pomoću manuelnog sistema API 20E pri čemu je dobijen profil 6704752. Korišćenjem softvera Apilabplus V 3.3.3 bioMérieux dobijen je procenat identifikacije %Id=99,9 (*Salmonella spp.*). Pozitivni biohemijski testovi bili su: arginin dihidrolaza (ADH), lizin decarboksilaza (LDH), ornitin decarboksilaza (ODC), korišćenje citrata (CIT), produkcija vodonik sulfida (H₂S), glukoza (GLU), manitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), ramnoza (RHA), melibioza (MEL), arabinioza (ARA). Negativni biohemijski testovi bili su: β-galaktosidaza (ONPG), ureaza (URE), triptofan deaminaza (TDA), produkcija indola (IND), produkcija acetoina (VP), hidroliza želatina (GEL), saharoza (SUC), amigdalin (AMY), oksidaza (OX). Dokazano je prisustvo *Salmonella spp.* u šest od 48 briseva ljuski jajeta (12,5%). Dodatni testovi su potvrdili da je kod svih šest uzoraka u pitanju vrsta *Salmonella enteritidis*. Kontaminacija enterobakterijama nije pronađena u unutrašnjosti ovih jaja. S obzirom na dokazano prisustvo salmonele na površini jaja japanske prepelice u interesu javnog zdravlja prevencija salmoneloze treba da pored vakcinacije obuhvati i kontinuiranu bakteriološku kontrolu jaja, vode i hrane za prepelice kao i uslova životne sredine u farmama.

Ključne reči: *Salmonella spp.*, jaja japanske prepelice.

1. UVOD

Cilj ovog istraživanja bio je izolacija i identifikacija *Salmonella spp.* sa površine ljuske i unutrašnjeg sadržaja prepeličjih jaja. Jaja japanske prepelice se u ljudskoj ishrani sve češće koriste i u sirovom stanju. Sveža jaja u ljusci ne smeju sadržavati bakterije *Salmonella* vrste u 50 g (Narodna skupština SRJ, 1993). Salmoneloza je jedna od bolesti koja se prenosi hranom i koja se javlja konzumiranjem zaraženih sirovih ili nedovoljno kuvanih jaja. Ova bolest je glavni uzrok bakterijskih crevnih bolesti i kod ljudi i kod životinja. Procenjuje se da svake godine u Sjedinjenim Državama ima 1,4 miliona slučajeva salmoneloze među ljudima (Mead et al., 1999). Trenutno postoji 2463 serotipa (serovara) salmonele (Popoff et al., 2000).

Pandemija salmoneloze objašnjava se činjenicom da *Salmonella spp.* ima sposobnost da kontaminira jaja bez izazivanja vidljivih znakova bolesti kod zaraženih ptica. Jaja mogu biti kontaminirana salmonelom na dva načina: preko zaraženog reproduktivnog tkiva ptica (vertikalni prenos) i sekundarnom kontaminacijom ljuske jajeta (horizontalni prenos) tj. u kontaktu jajeta sa fekalijama ptica i putem vektora: farmeri, glodari, insekti itd. (Poppe et al., 1998).

Poljoprivredna domaćinstva u Srbiji često ne zadovoljavaju neophodne sanitarne standarde za gajenje prepelica. Za gajenje prepelica nosilja najčešće se koriste kavezi (Slika 1).

Slika 1: Kavezno gajenje japanskih prepelica (Coturnix japonica) - farma u Vranju



Glavni izvori bakterijske kontaminacije prepeličjih jaja su zaražena hrana za životinje (koja se najčešće proizvodi od svinjskih i govedih iznutrica), nepravilan higijenski smeštaj i čuvanje jaja u neadekvatnim uslovima. Stalni boravak u skućenom prostoru stvara povoljne uslove za razmnožavanje najrazličitijih mikroorganizama.

Slika 2: Ispitivani uzorci jaja japanske prepelice (Coturnix japonica)



Predmet ispitivanja bila su 48 jaja japanske prepelice starosti sedam dana poreklom iz individualnog domaćinstva. Ispitivano je prisustvo *Salmonella* kako u unutrašnjosti jajeta tako i na površini ljuske.

2. MATERIJAL I METODE

U ovoj studiji su korišćena 48 jaja japanske prepelice starosti sedam dana, nasumično prikupljena u jesen 2021. godine na farmi individualnog gazdinstva u Vranju, Republika Srbija.

Za izolaciju smo koristili standardne bakteriološke metode (Narodna skupština SFRJ, 1980), (WHO, 2003). Ispitivanje prisustva salmonela vršeno je uzimanjem brisa sa površine ljuski jajeta i uzimanjem cele unutrašnjosti

jajeta. Nakon uzimanja brisa sa površine jaje se očisti vatom natopljenom alkoholom i na emajliranoj plitkoj posudi opali plamenikom. Na ljusci se sterilnim priborom (skalpel, makaze) napravi otvor kroz koji se uvuče kapaljka kojom se sadržaj jajeta prenese se u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima (na 20 g uzorka se doda 180 ml fiziološkog rastvora). Zatim se uzorak mućkanjem dobro homogenizuje čime se dobija osnovno razređenje Na odmerenu količinu uzorka (ili brisa) doda se podloga za obogaćenje (selenit bujon) i mućkanjem dobro homogenizuje, a zatim inkubira 18 do 24 časa na 37 °C. Posle inkubacije, podloga se dobro promućka i po jedna eza se zasejava po površini *SS* agara i *Wilson Blair*-ovog bizmutsulfidnog agara. Zasejane podloge se inkubiraju 24 do 48 časova na 37 °C. Izrasle kolonije, za koje se sumnja da su salmonele, presejavaju se na Kliglerov dvostruki šećer. Kolonije koje i na ovom dvostrukom šećeru daju reakcije karakteristične za salmonele, dalje se identifikuju pomoću manualnog sistema API 20E

API 20E (bioMérieux - France) je manualni identifikacioni sistem za identifikaciju predstavnika familije *Enterobacteriaceae*. Sistem koristi 20 standardizovanih biohemijskih testova i bazu podataka sa mogućnošću identifikacije 108 različitih taksona (Boeufgras et al., 1987). *API 20E* strip se sastoji od 20 mikroepreveta koje su ispunjene dehidriranim substratima. Pikira se pojedinačna dobro izolovana kolonija sa odgovarajuće izolacione agarne ploče. Pažljivo se emulguje sve dok se ne dobije homogena bakterijska suspenzija. Ovom suspenzijom se napune i mikrotube i tzv. „kupule“ testova *CIT*, *VP*, i *GEL*. Kod svih drugih testova pune se samo mikrotube ali ne i kupule. Nakon inokulacije mikrotuba, označenih kao *ADH*, *LDC*, *ODC*, *H₂S* i *URE*, potrebno je stvoriti anaerobizu tako što se kupule pune mineralnim uljem. Posle inokulacije boks za inkubaciju se zatvara i inkubira na 37 °C u trajanju 18 - 24 h. Tokom inkubacije, nastali metabolici dovode do promene boje (dolazi do spontane promene boje ili se boja uočava nakon dodavanja reagensa). Biohemijske reakcije *API 20E* stripa očitavaju se nakon 18 - 24 h inkubacije i to na osnovu specifične promene boje svakog substrata (promena boje je ili spontana ili se detektuje nakon dodavanja reagensa). Reakcije se očitavaju prema tabeli za čitanje a identifikacija se dobija korišćenjem priručnika sa indeksima analitičkih profila *API 20E* ili upotrebom identifikacionog softvera.

Dodatni biohemijski testovi urađeni su prema standardnoj proceduri za identifikaciju *Salmonella spp.* (Perilla, 2003).

3. REZULTATI

Biohemijska karakterizacija sojeva urađena je pomoću manualnog sistema *API 20E* pri čemu je za sve sojeve dobijen numerički profil 6704752. Korišćenjem softvera Apilabplus V 3.3.3 bioMérieux sojevi su identifikovani kao *Salmonella spp.* (%Id=99,9). Pozitivni biohemijski testovi bili su: arginin dihidrolaza (*ADH*), lizin decarboksilaza (*LDH*), ornitin decarboksilaza (*ODC*), korišćenje citrata (*CIT*), produkcija vodonik sulfida (*H₂S*), glukoza (*GLU*), manitol (*MAN*), inositol (*INO*), sorbitol (*SOR*), ramnoza (*RHA*), melibioza (*MEL*), arabinoza (*ARA*). Negativni biohemijski testovi bili su: β-galaktozidaza (*ONPG*), ureaza (*URE*), triptofan deaminaza (*TDA*), produkcija indola (*IND*), produkcija acetoina (*VP*), hidroliza želatina (*GEL*), saharoza (*SUC*), amigdalina (*AMY*), oksidaza (*OX*).

Prisustvo *Salmonella spp.* dokazano je u 6 od 48 briseva ljuski jajeta. Unutrašnjost svih jaja nije bila kontaminirana sa *Salmonella spp.* kao ni sa drugim enterobakterijama (izolacija na Endo agaru). Dodatni testovi su potvrdili da je kod svih šest uzoraka reč o *Salmonella enteritidis* (Brenner et al., 2020) koja je identifikovana i sero grupisana testom koagulacije i testom aglutinacije na staklenoj pločici (Murray, 2003.), (Radojičić et al., 2016).

4. DISKUSIJA

Salmoneloze su jedne od najznačajnijih zoonoza u svetu. Sve je više naučnih dokaza da kontaminacija unutrašnjeg sadržaja jaja potiče od infekcije reproduktivnih organa ptice. Takođe postoje i indicije da *S. enteritidis* uz pomoć svojih antimikrobnih molekula preživljava napade imunog sistema ptice, tokom formiranja jajeta u jajovodu ptice i unutar samog jajeta (Gantois et al., 2009). Radi detekcije pojave i širenja opasnih sojeva nadzor prisustva *Salmonella spp.* je neophodan u svakoj fazi proizvodnje i komercijalizacije jaja japanske prepelice („od farme do trpeze“).

Biohemijska karakterizacija je urađena pomoću manualnog sistema *API 20E* pri čemu je kod svih uzoraka dobijen profil 6704752 što se odgovara taksonu *Salmonella spp.* (%Id=99,9). U literaturi se soj sa ovakvim biohemijskim karakteristikama pominje kao prouzročivač dijareje kod dece (Yousif et al, 2011).

U šest (12,5%) od 48 uzoraka briseva ljuski prepeličijih jaja utvrđeno je prisustvo *Salmonella enteritidis*. Unutrašnjost svih ispitivanih jaja nije bila kontaminirana sa *Salmonella spp.* kao ni sa drugim enterobakterijama. Prema raspoloživim podacima ovo je prva studija u ovom delu Srbije koja istražuje pojavu *Salmonella spp.* u ljusci i unutrašnjem sadržaju prepeličijih jaja. U Iranu, na primer, *S. enteritidis* (SE) je najrašireniji serotip zagađivača prepeličijih jaja (Staji et al., 2002).

5. ZAKLJUČAK

Salmoneloza je bolest ljudi koja se prenosi hranom i to najčešće konzumiranjem zaraženih sirovih ili nedovoljno kuvanih jaja. Pandemija salmoneloze objašnjava se činjenicom da *Salmonella spp.* ima sposobnost da kontaminira jaja bez izazivanja vidljivih znakova bolesti kod zaraženih ptica. Jaja japanske prepelice se u ljudskoj ishrani sve češće koriste i u sirovom stanju što doprinosi širenju ove zoonoze. Glavni izvori bakterijske kontaminacije prepeličjih jaja su zaražena hrana za životinje, nepravilan higijenski smeštaj i čuvanje jaja u neadekvatnim uslovima. Naše istraživanje nije pokazalo prisustvo enterobakterija u unutrašnjosti svih 48 ispitivanih uzoraka. Dokazano je prisustvo *Salmonella spp.* u šest od 48 briseva ljuski jajeta (12,5 %). Numerički profil (API 20E) svih ovih sojeva bio je 6704752 (%Id=99,9) što odgovara taksonu *Salmonella spp.* Manuelni API 20 E sistem se pokazao kao pouzdan metod identifikacije *Salmonella spp.* izolata dobijenih iz briseva površine ljuski prepeličjih jaja.

Dodatni testovi su potvrdili da je kod svih šest izolata reč o *Salmonella enteritidis* (identifikacija dobijena serološkim i testom aglutinacije). Soj sa ovakvim biohemijskim karakteristikama opisan je i kao prouzrokovaoč dijareje kod dece.

Ovo je prva studija u ovom delu Srbije koja je istraživala prisustvo *Salmonella spp.* u ljusci i unutrašnjem sadržaju prepeličjih jaja. Dokazano je prisustvo *S. enteritidis* na površini ljuske ovih jaja na području Grada Vranja, Republika Srbija. Prema dobijenim rezultatima prisutan je serotip *S. enteritidis*.

S obzirom na potvrđeno prisustvo salmonele na površini jaja japanske prepelice, u interesu javnog zdravlja prevencija salmoneloze zaštita treba da pored vakcinacije obuhvati i kontinuiranu bakteriološku kontrolu jaja, vode i hrane za prepelice kao i uslova životne sredine u svim farmama.

LITERATURA

- Boeufgras, J. M., Balzer, J. L., Allard, F., & Diaz, I. (1987). A new computer program for routine interpretation of API systems. Book of Proceedings of the 2nd Conference on Taxonomy and Automatic Identification of Bacteria, June 29 – July 3, 1987, Computer Department, API Systems, La Balme-Les Grottes, France.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F.J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2020). *Salmonella* nomenclature, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 38. (7)
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000?permanently=true>
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 718-738.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., & Tauxe, R. B. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 51999607-625.
- Murray (2003). Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, ASM Press, Washington D.C.,
- Narodna skupština SFRJ (1980). *Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica*. Beograd: Službeni list SFRJ, br. 25/80
- Narodna skupština SRJ (1993). *Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu*. Beograd: Službeni list SRJ, br. 26/93, 53/95, 46/02)
- Perilla, M. (2003). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World, Centers for Disease Control and Prevention: National Center for Infectious Diseases and World Health Organization: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization 2003.
- Poppe, C., Duncan, C. L., & Mazzocco, A. (1998). *Salmonella* Contamination of Hatching and Table Eggs: A Comparison. *Can. J. Vet. Res.* 1998; 62(3):191-8.
- Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Brenner, F. W. (2000). Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 151200063-65.
- Radojičić, M., Marković, M., Nišavić, J., Krnjaić, D., & Zdravković, N. (2016). Examining the presence of specific antibodies against *Salmonella* Enteritidis in vaccinated and unvaccinated poultry. *Veterinarski glasnik*, 70 (1-2), 3-12.
- Staji, H., Ghazvinian, K., Vayeghan, A.J., Salimi, M., & Mahdavi, A. (2012). Prevalence of *Salmonella* spp. in the quail egg interior contents: A provincial study. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6, 191-196.
- WHO (2003). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition, 2003.
http://www.who.int/medical_devices/publications/basic_lab_procedures_clinical_bact/en/
- Yousif, A. A. R., & Harab, A. A. H. (2011). Isolation and serotyping of *Salmonella* specis in diarrheal children. *University of Thi-Qar Journal Of Medicine*, 5(1), 149-155.