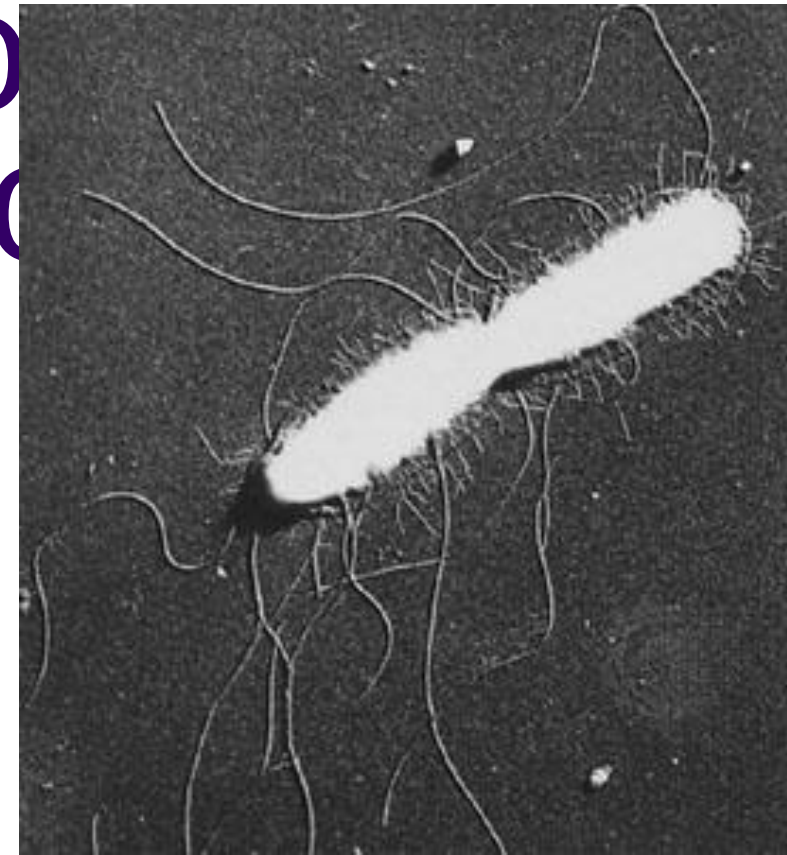
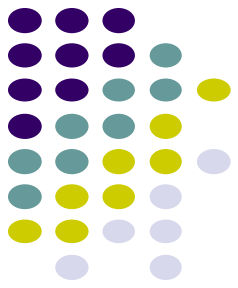


# GENUL *SALMONELLA*. MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SALMONELOZEI



# CLASIFICARE



**Genul: *Salmonella*** (Daniel Elmer Salmon, veterinar american, a descoperit bacteria în 1885)

**Specii: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*** (anterior subspecia V)

**Subspecii ale speciei *S.enterica*:** *enterica* (subsp. I), *salamae* (subsp. II), *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV), *indica* (subsp. VI)

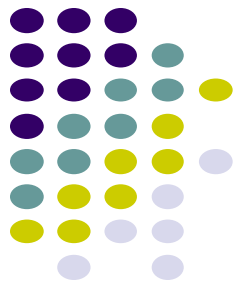
Majoritatea tulpinilor izolate din patologii umane (99,5%) aparțin s/s *S.enterica enterica* cu peste 2600 de serovariante: *S. London*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S.Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S.Choleraesuis*, etc

***Salmonella enterica* subspecia *enterica* serovar Typhi**

**sau**

***Salmonella Typhi (S. Typhi)***

# CLASIFICAREA KAUFFMAN-WHITE (conform structurii antigenice)



- **Ag O** – 67 varietăți antigenice (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, ... O<sub>65</sub>, etc), permite repartizarea salmonelelor în serogrupe (A, B, C, D, E,...Z, O<sub>51</sub>,...)

Fracții antigenice majore desemnează grupa:

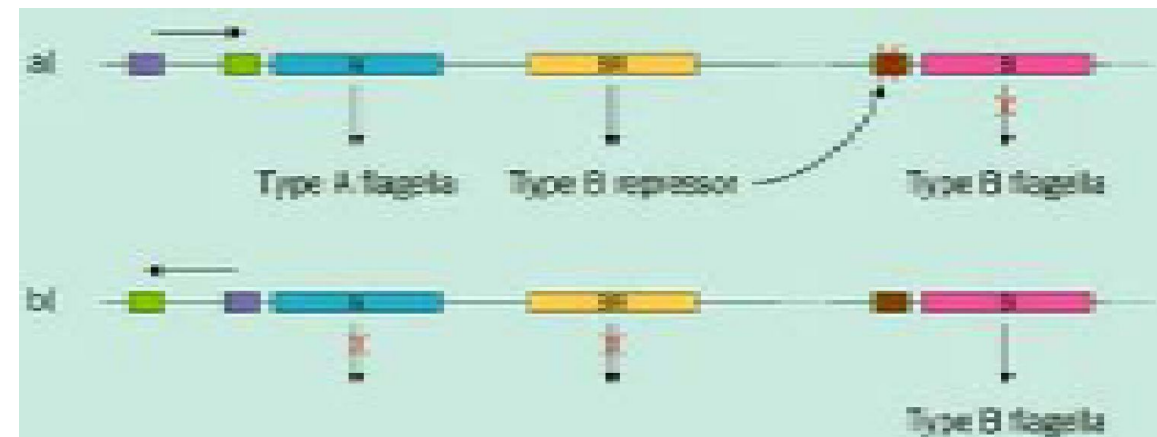
**O<sub>2</sub>** – grupa **A**; **O<sub>4</sub>** – **B**, **O<sub>6</sub>** – **C**, **O<sub>9</sub>** – **D**, etc

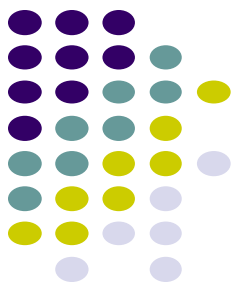
Fracții antigenice minore – **O<sub>1</sub>**, **O<sub>12</sub>** - sunt comune

- **Ag H** – definește serovariante în cadrul grupei. Structura flagelinei este determinată de 2 gene cromozomale diferite, care se exprimă simultan sau alternativ (variație de fază, frecvența  $10^{-4}$ )

Ag H faza 1– Ha; Hb; Hc; Hd; Hg,m...

Ag H faza 2– H<sub>1,2</sub>; H<sub>1,5</sub>; H<sub>1,7</sub>,...





Serovar monofazic: **O<sub>1,2,12</sub>:H<sub>a</sub>** (S.Paratyphi A)

Serovar difazic: **O<sub>1,4,12</sub>:H<sub>b</sub>H<sub>1,2</sub>** (S.Paratyphi B)

- **Ag Vi (K)**, poliozidic, termolabil, prezent la S.Typhi, S.Paratyphi C, S.Dublin. Este concentrat la polii bacteriei. Mascheaza Ag O. Distrus prin fierbere 10 min.

S. Typhi – **O<sub>9,12</sub>:H<sub>d</sub>:Vi<sup>+</sup>** / **O<sub>9,12</sub>:H<sub>d</sub>:Vi<sup>-</sup>**

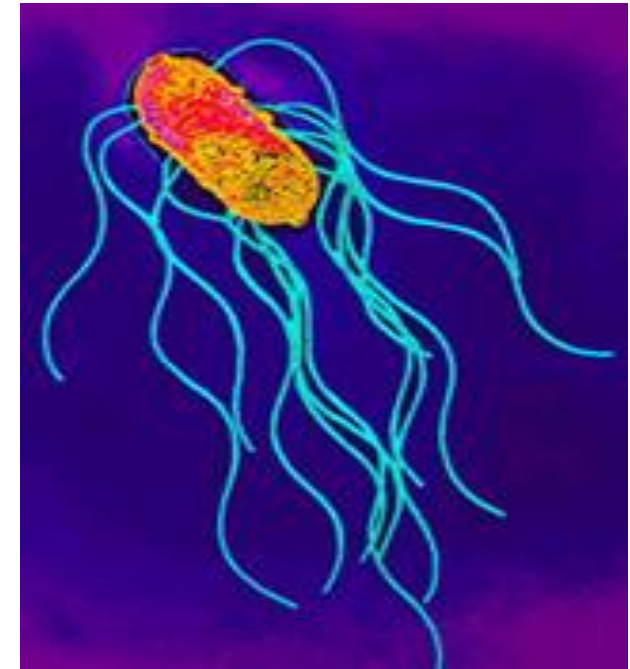
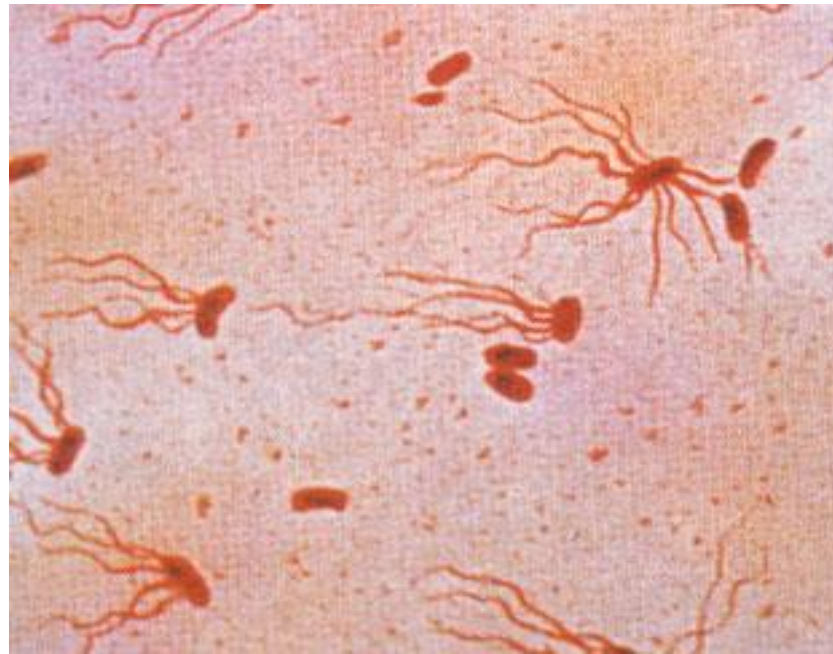
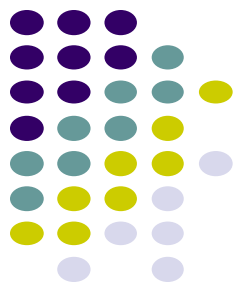
Conform patogenității pentru gazdă se disting:

- I. **Salmonenele monopatogene (umane)** (S.Typhi, S.Paratyphi A, S.Paratyphi B)
- II. **Salmonenele bipatogene** (patogene pentru om și animale, ubicvitare) – majoritatea.

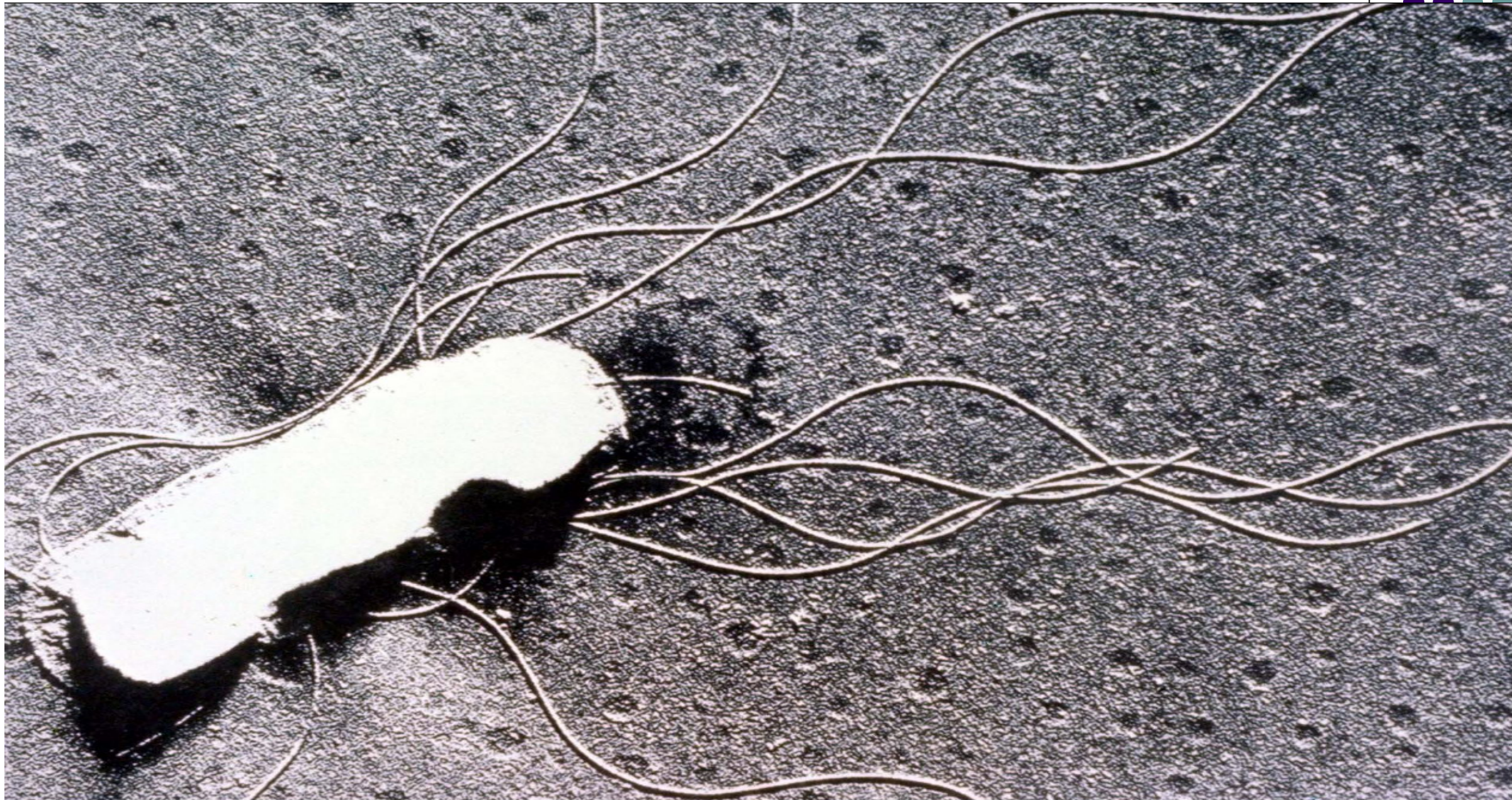
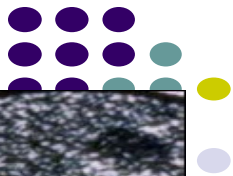
Grupa	Serovarul	Antigenul O	Vi	Antigene H	
				faza 1	faza 2
<b>A</b>	<b>Paratyphi A</b>	<b>1,2,12</b>		<b>a</b>	<b>-</b>
<b>B</b>	<b>Paratyphi B</b>	<b>1,4,5,12</b>		<b>b</b>	<b>1,2</b>
	<b>Wien</b>	<b>1,4,12,27</b>		<b>b</b>	<b>l,w</b>
	<b>Typhimurium</b>	<b>1,4,5,12</b>		<b>i</b>	<b>1,2</b>
	<b>Derby</b>	<b>1,4,12</b>		<b>f,g</b>	<b>-</b>
<b>C</b>	<b>Paratyphi C</b>	<b>6,7</b>	<b>+</b>	<b>c</b>	<b>1,5</b>
	<b>Virchov</b>	<b>6,7</b>		<b>r</b>	<b>1,2</b>
	<b>Infantis</b>	<b>6,7</b>		<b>r</b>	<b>1,5</b>
	<b>Bovismorbificans</b>	<b>6,8</b>		<b>r</b>	<b>1,5</b>
<b>D</b>	<b>Typhi</b>	<b>9,12</b>	<b>+</b>	<b>d</b>	<b>-</b>
	<b>Enteritidis</b>	<b>1,9,12</b>		<b>g,m</b>	<b>-</b>
	<b>Panama</b>	<b>1,9,12</b>		<b>l,v</b>	<b>1,5</b>
	<b>Dublin</b>	<b>1,9,12</b>	<b>+</b>	<b>g,p</b>	<b>-</b>
	<b>Gallinarum</b>	<b>1,9,12</b>		<b>-</b>	<b>-</b>
<b>E</b>	<b>London</b>	<b>3,10</b>		<b>l,v</b>	<b>1,6</b>
	<b>Anatum</b>	<b>3,10</b>		<b>e,h</b>	<b>1,6</b>

## Caractere morfologice

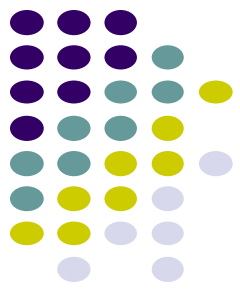
*Salmonella* – bacterii gram-, mobile peritriche (S.Gallinarum, – imobilă), asporogene.











- **Caractere de cultură**

1. Medii de **îmbogățire** : Muller, Kauffman (medii cu bilă, tetracionat de Na), bulion cu selenit de Na
2. Medii DD de **izolare a culturii pure**: Endo, Levin, Ploskirev, SS (colonii S, lactozo -); mediul Wilson-Blair cu sulfid de bismut (colonii negre)
3. Medii DD de **acumulare și diferențiere**: Olkenițki, Kligler (glucoza A/AG, lactoza-,  $H_2S^+$ , ureaza-)

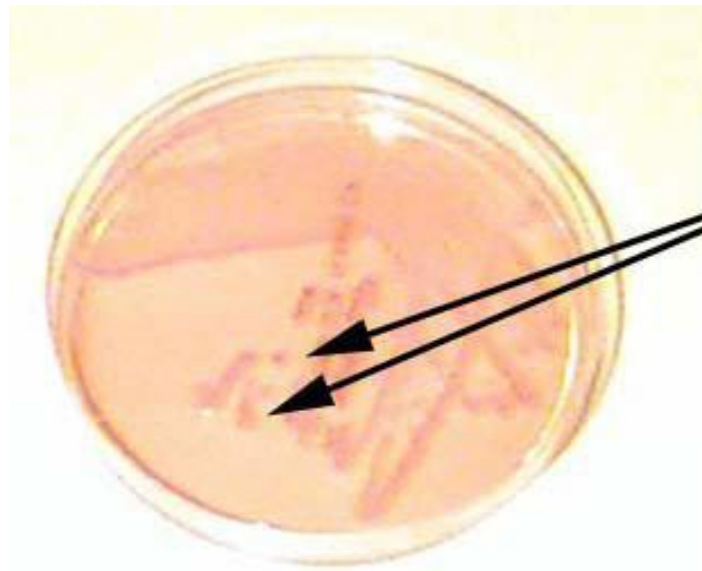
**Teste primare**: utilizează citratul de Na, produc  $H_2S$ , MR+, LDC+, mobilitate+, celelalte teste – negative.

**Teste secundare**: scindează glucidele A/AG, indol-, ornitindecarboxilaza+, etc

**EXCEPȚIE**: S.Typhi – citrat-,  $H_2S^-$ , scindează glucoza până la acid;

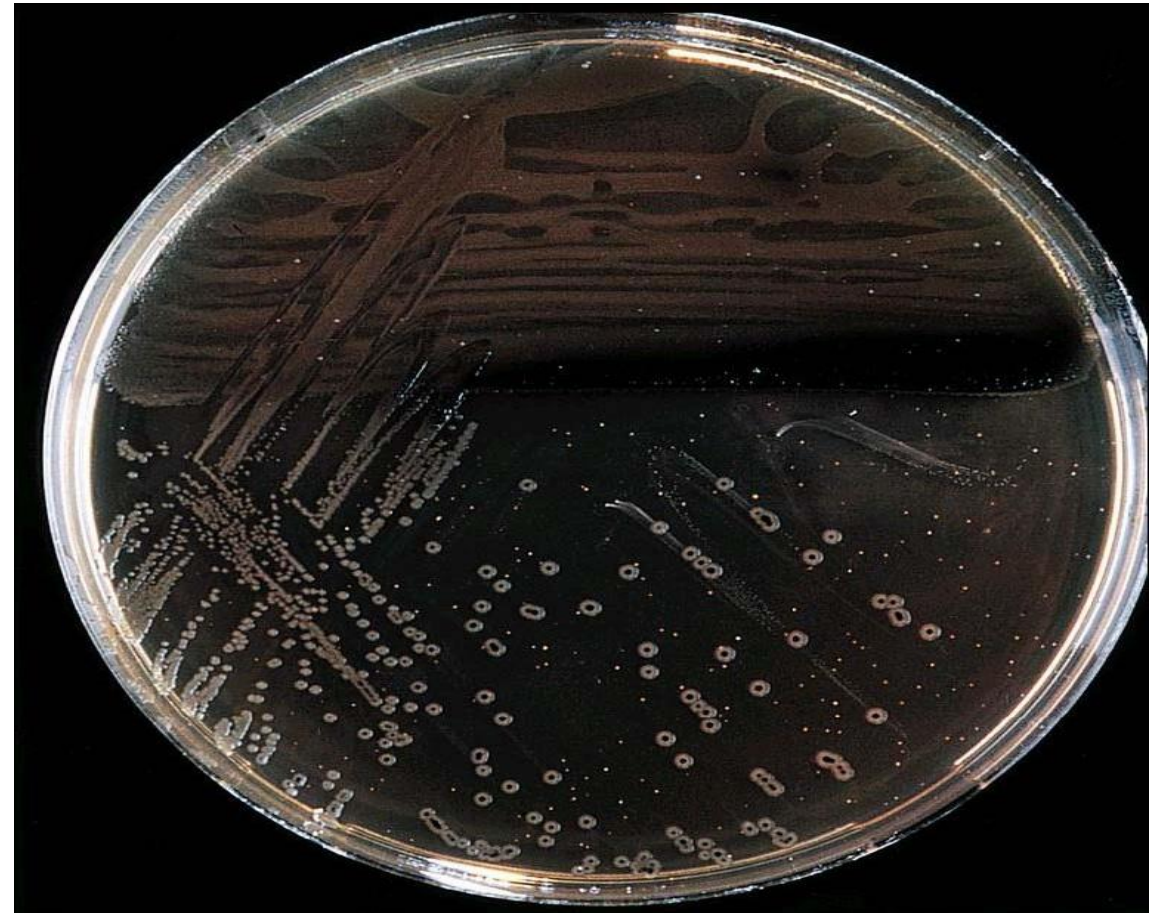
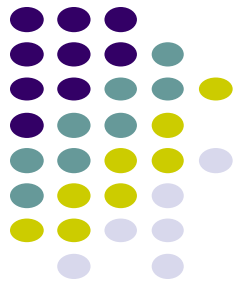
S.Paratyphi A –  $H_2S^{+/-}$ , LDC-

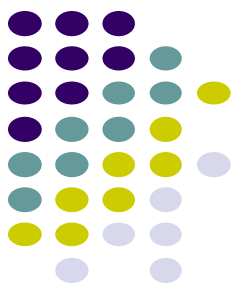


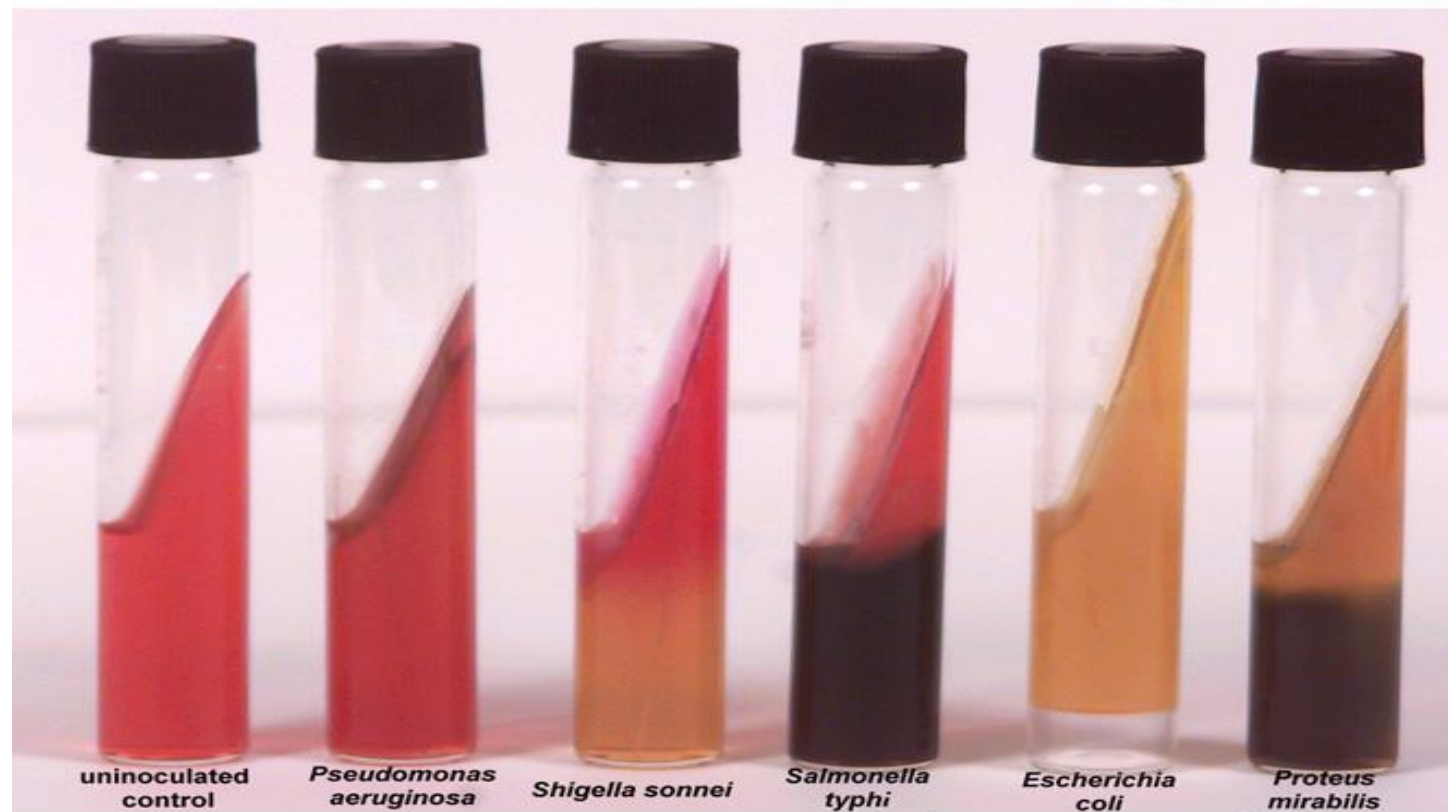


Colonies of non-lactose fermenter

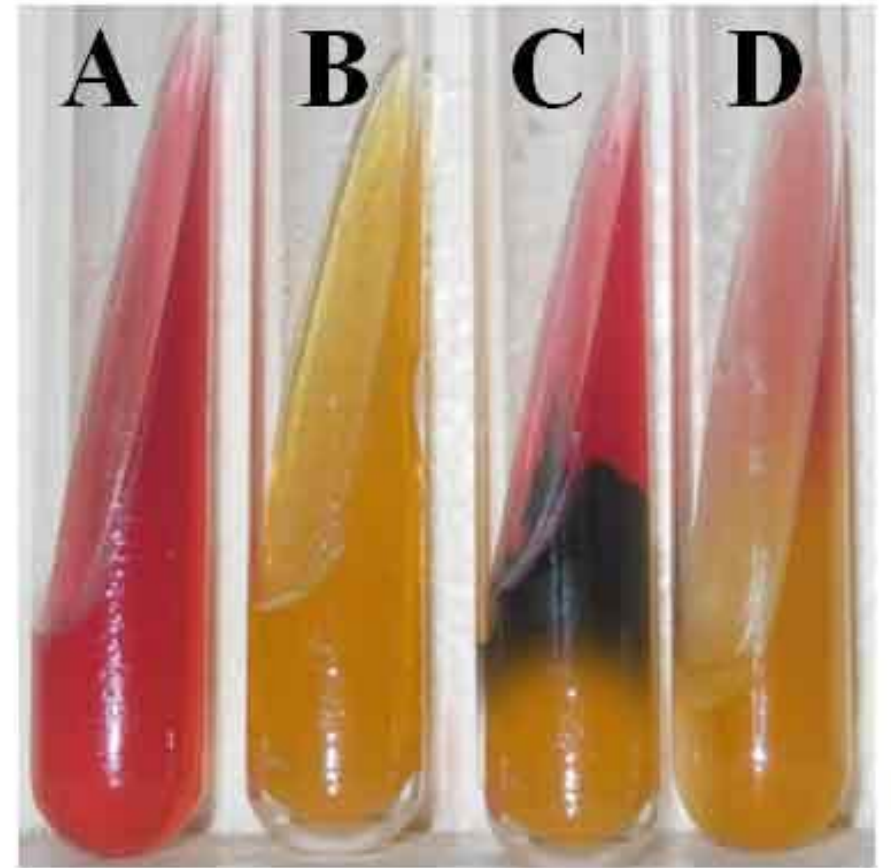
ASM MicrobeLibrary.org © Johnson







ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain



**A) *Pseudomonas aeruginosa*: Gluc (-), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)**

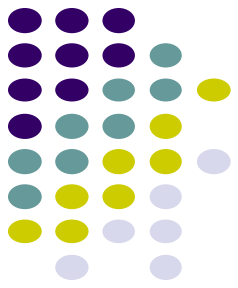
**B) *Escherichia coli*: Gluc (+), Lac/Suc (+), H<sub>2</sub>S (-)**

**C) *Salmonella typhimurium*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (+)**

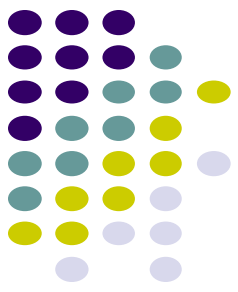
**D) *Shigella boydii*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)**



# FACTORI DE PATOGENITATE

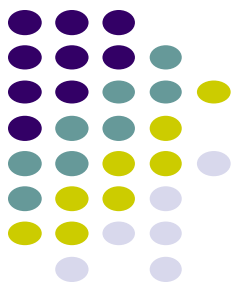


- Fimbrii (adeziune)
- Capacitatea de a penetra în celule (sistem de secreție III) și de multiplicare intracelulară (macrofage, celule epiteliale)
- Endotoxina
- Citotoxine (SLT) – inhibă sinteza proteică (necroză)
- Enterotoxine (LT, ST) – activează adenilat/guanilatciclazele membranare (diaree)
- Siderofori (captarea Fe)
- Ag Vi (antifagocitar, inhibă activarea C, rezistență la activitatea bactericidă a serului)



- Majoritatea salmonelelor (98%) sunt sensibile la bacteriofagul O1. Există bacteriofagi cu specificitate de specie și variantă.
- **Habitat:** intestinul omului, animalelor, păsărilor, reptilelor. Vertebratele acvatice (păsări, reptile), păsările domestice, bovinele, ovinele, porcinele, etc sunt frecvent contaminate (carne, ouă)
- **Rezistența în mediul extern:** salmonelele rezistă la 70°C 30 min., rezistente la frig și concentrații mari de sare. Supraviețuiesc mai multe săptămâni în mediu sec și luni în apă. Se înmulțesc în produse alimentare la temperatura camerei.

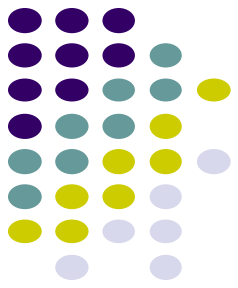
# ROLUL SALMONELELOR ÎN PATOLOGIA UMANĂ



- **SALMONELOZE:**
  - I. **Febre tifo-paratifoide**
  - II. **Salmoneloze digestive** (toxi-infecții alimentare, gastro-enterite)
  - III. **Manifestări extra-digestive:**
    - bacteriemii nontifoidice
    - infecții pleuro-pulmonare
    - afecțiuni osteo-articulare (osteite, osteomielite, artrite septice, etc)
    - infecții nozocomiale
    - infecții cardio-vasculare (pericardită, arterite)
    - infecții urinare
    - infecții abdominale (colecistită, abces al ficatului, splinei)
    - infecții ale SNC (meningită, abces al creierului, abces epidural, etc)

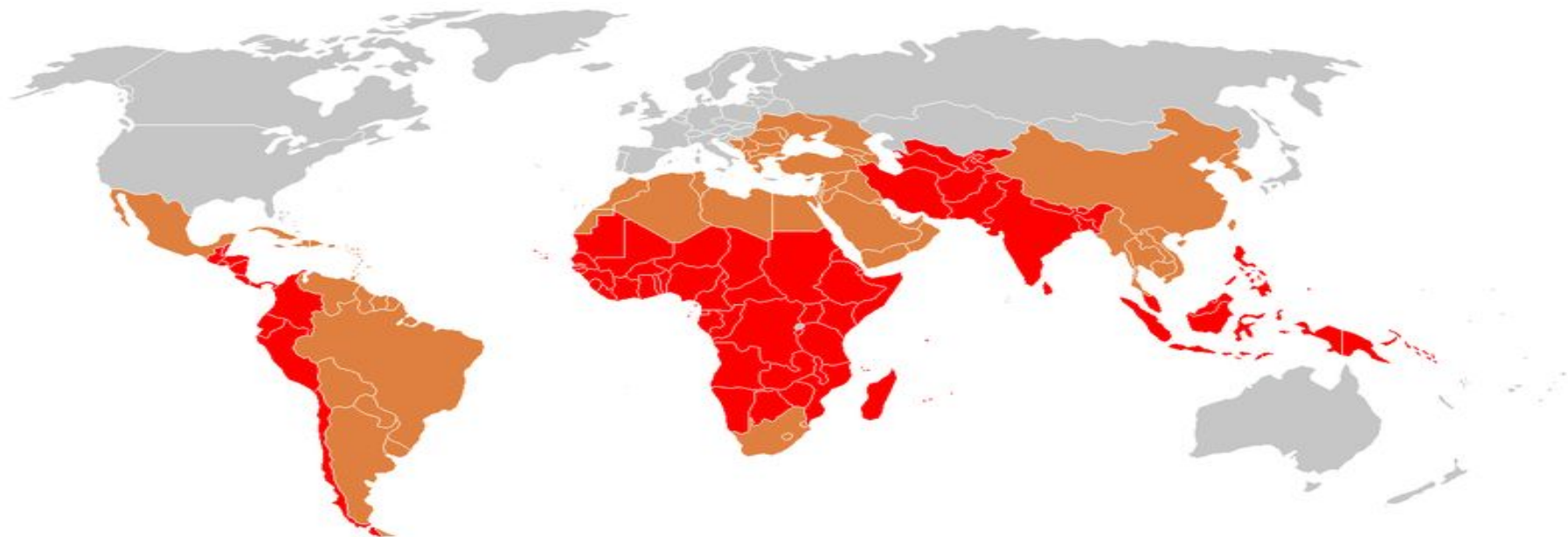


# FEBRELE TIFO-PARATIFOIDE

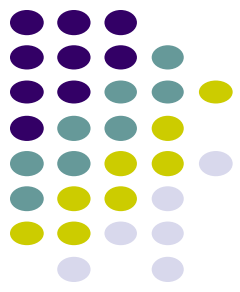


- Agenții cauzali – *S.Typhi*, *S.Paratyphi A*, *B*, (*C*)
- Sursa de infecție – omul bolnav, purtătorul
- Contaminarea fecal-orală (apă, alimente), contact direct
- Doza infectantă –  $10^5$  -  $10^6$  bacterii

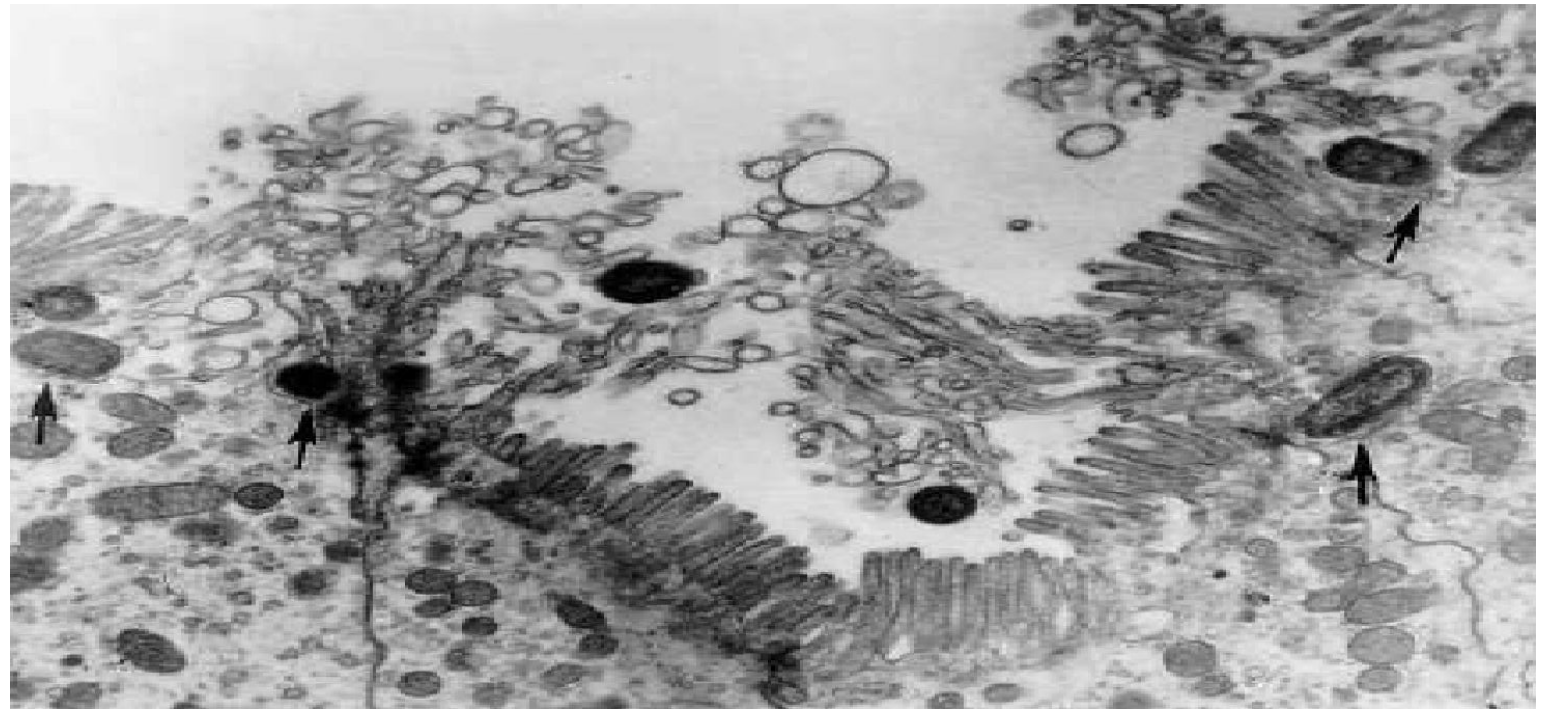
OMS – anual 18 – 33 mln cazuri de febră tifoidă, 500.000 – 600.000 cazuri de deces

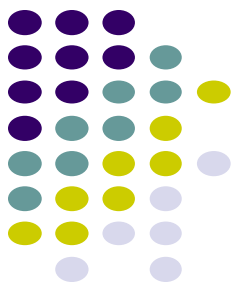


# PATOGENEZA



- Traversarea epiteliului intestinal intact
- Invazia și multiplicarea intracelulară la nivelul plăcilor Peyer și țesutului limfoid al tubului digestiv (**perioada de incubație**)
- Pătrunderea în ganglionii limfatici mezenterici cu **multiplicarea salmonelelor în macrofage** (**perioada prodromală**)





*I săptămână de boală (bacteriemie).* Invadarea fluxului sangvin via sistemul limfatic (diseminarea germenilor) cu eliberarea endotoxinei. Endotoxina pe cale sangvină parvine la centrul neurovegetativ al ventriculului 3, determinând febră, stare de tifos, colaps cardio-vascular, etc.

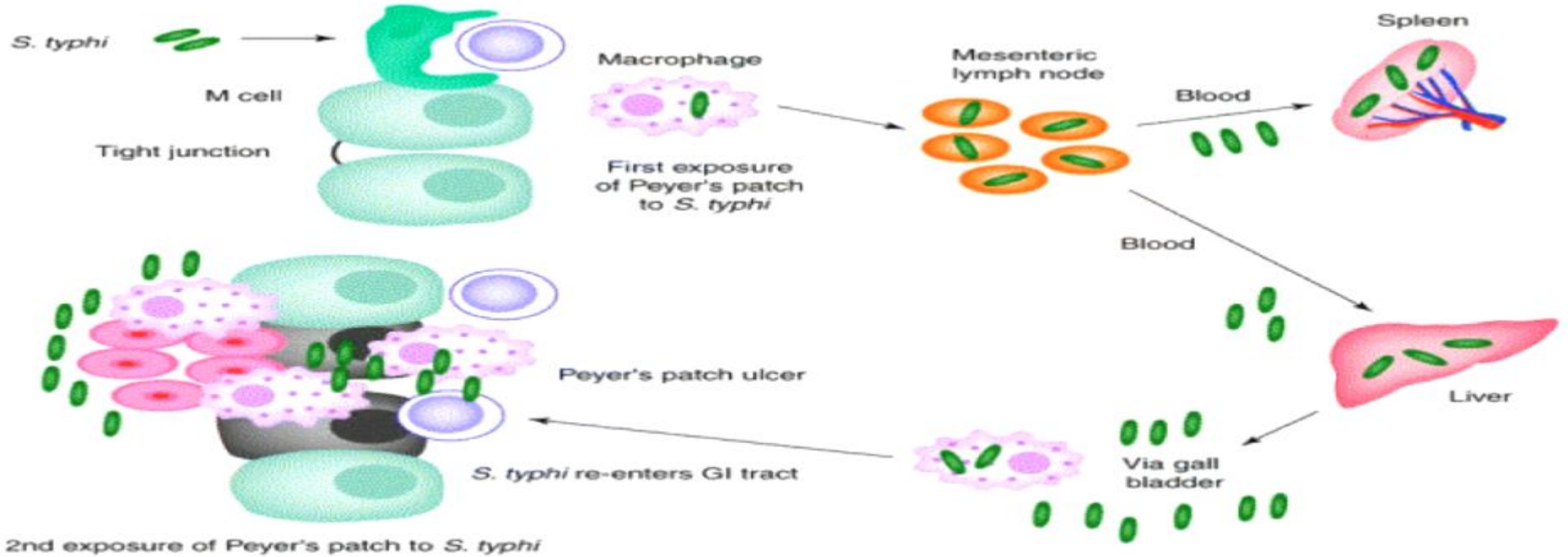
*II săptămână de boală (difuzie parenchimotoasă)*

Bacteriile sunt fixate în organele SRE și se multiplică în ficat, splină, măduvă osoasă, țesut limfoid, etc. *Din această perioadă începe eliminarea salmonelelor cu saliva, materiile fecale, urina, bila, etc.*

*III-IV săptămână de boală (faza alergică).* Din ficat salmonelele pătrund în căile biliare, apoi iarăși în intestin. La nivelul plăcilor Peyer se dezvoltă o reacție de hipersensibilitate tip 4 - necroză, *ulcerații*










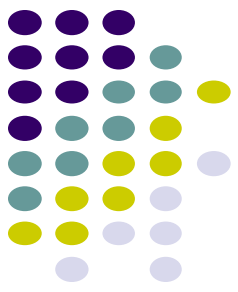
# S. Typhi Pathogenesis



2nd exposure of Peyer's patch to *S. typhi*

Key:

- |   |   |
|---|---|
|  Peyer's patch           |  Red blood cells        |
|  <i>Salmonella typhi</i> |  Necrotic Peyer's patch |
|  Macrophage              |  T cells                |
|  Lymph node              |   |



- **Manifestări clinice**

- I. Perioada de **incubație** - 1-3 săptămâni

- II. Perioada **prodromală** (de invazie) – 1-3 zile

- III. Perioada de **stare**. Debut brutal, cu frison, febră 39-41 grade, cefalee, bradicardie, urmând frecvent deliriu calm, rareori agitat, stupoare, somnolență, posibil comă. Eruptii cutanate (rozeole) apar pe abdomen, torace, spate în ziua a 8-9 de boală (embolii limfatice cu bacterii). Constipație, uneori diaree, tulburări cardiovasculare.

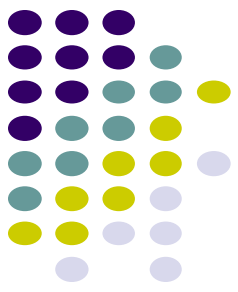
*Complicații:* hemoragii intestinale, perforarea intestinului, peritonită, miocardită, meningită, psihoză etc.

- IV. Perioada de **reconvalescență** (1-3-6 luni)



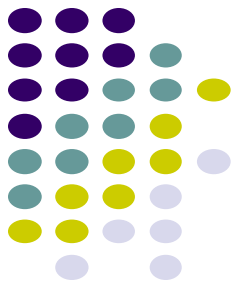






- **Imunitatea** – celulară, umorală
- 5-10% convalescenți – purtători până la 3 luni (cu depistarea salmonelelor în bilă sau/și urină)
- 3-5% convalescenți (cu litiază biliară) – purtători cronici– (1-10 ani – toată viața)
- **Recidive** sunt posibile (descărcări bacteriemice din focare profunde, forme L), se caracterizează prin simptome atenuate și evoluție de scurtă durată.

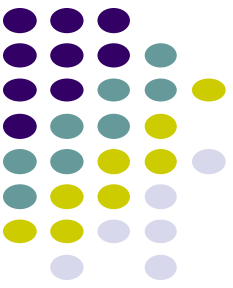
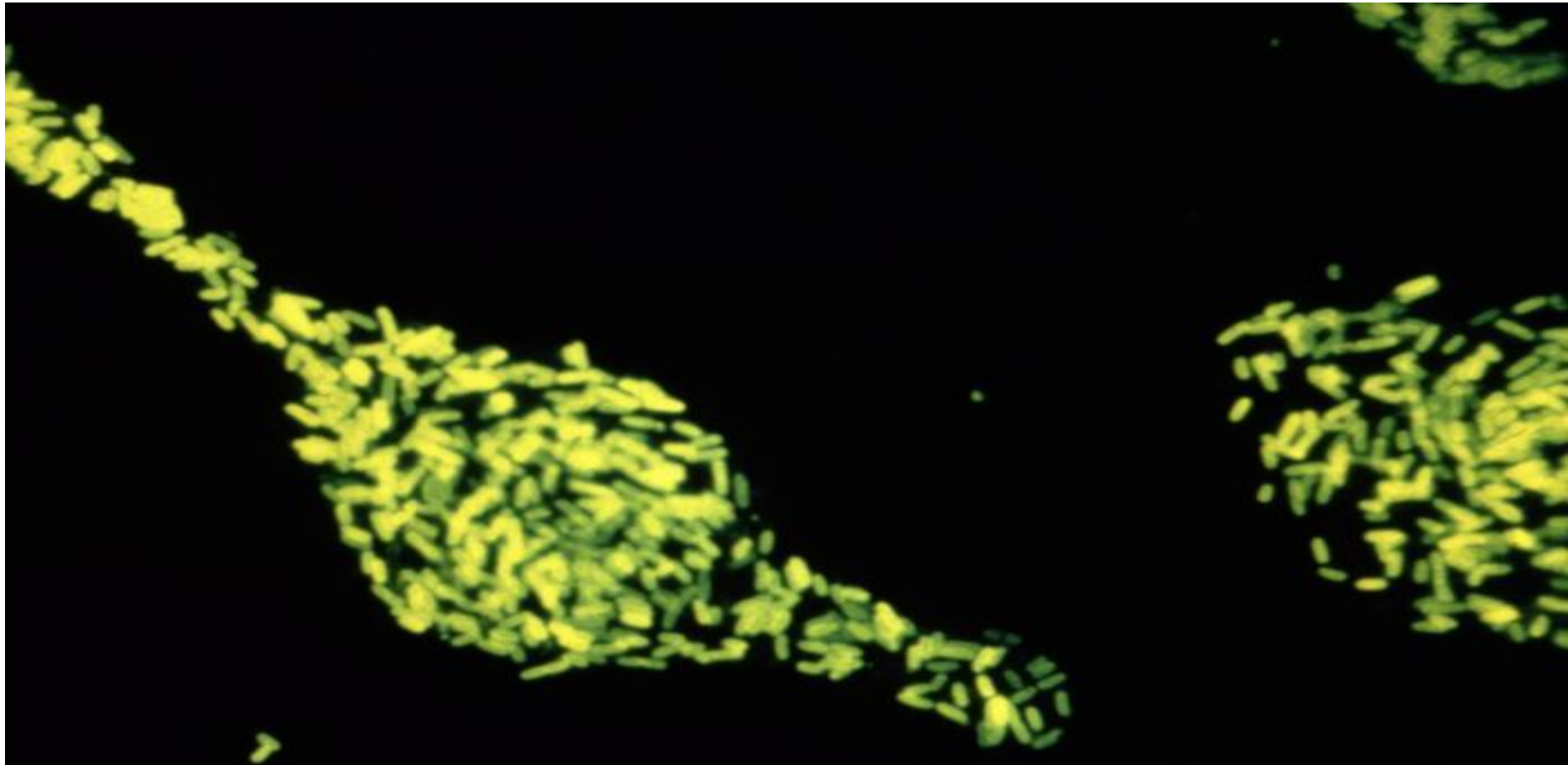
# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBRELOR TIFO-PARATIFOIDE



- **PRELEVATE:** **sânge** (perioada febrilă, în special I săptămână de boală), **urină** (începând cu a II săptămână), **materii fecale** (II-III săptămână de boală), **exsudat din rozeole**, **ser sangvin** (din ziua a 7-ea), **bilă**, **măduvă osoasă**.

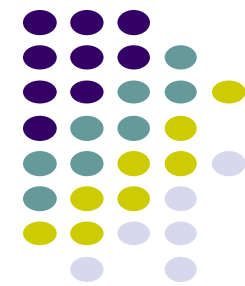
# METODE DE DIAGNOSTIC

- **Examenul microscopic – RIF, Gram**

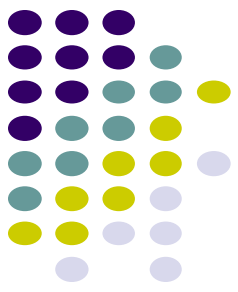




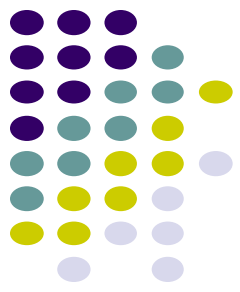
# Examenul bacteriologic



**Hemocultura** – 10-15 ml de sânge se însămânțează în 100 ml bulion biliat, mediul Rappoport, bulion glucozat 1% sau mediu bifazic pentru *îmbogățirea salmonelelor*. Se incubează la 37 grade și în zilele 1, 2, 3, 5, 7 și 10 se repică pe un mediu DD (Endo, Levin, Ploskirev, W-B) pentru *izolarea culturii pure*. Coloniile lactozo- se repică pe mediul Kligler (Olkenițki) pentru *acumularea culturii pure și identificarea preliminară*



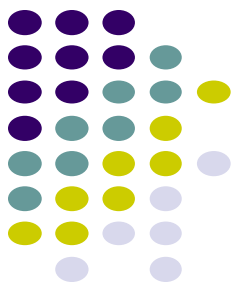
- *Identificarea finală* - în baza studiului caracterelor morfotinctoriale, de cultură, biochimice, antigenice (RA pe lamă cu seruri imune polivalente ABCDE, seruri monovalente anti-O de grup (02, 04, 06, 09, etc) , seruri monospecifice anti-H (de variantă), seruri anti-Vi, sensibilitatea la bacteriofagi).
- **Rezultatul** definitiv negativ-în ziua a 11.



- **Rozeolocultura** (exsudatul din rozeole se inoculează în 3-5 ml bulion biliat)
- **Mielocultura** (0,5 ml măduva osoasă din stern în 3-5 ml bulion biliat)
- **Bilicultura** (după 3-6 luni de la vindecare, 5-10 ml bilă se introduc în BP)

Roseolo-, mielo- și bilicultura se examinează ca și hemocultura

- **Coprocultura** (din săpt. 2) – 3-5 g materii fecale se însămânțează direct pe medii DD și pe medii de îmbogățire (Muller, Kauffman). Rezultat pozitiv – ziua 4-5, rezultat negativ – peste 3 zile.
- **Urocultura** (10 ml urină se centrifughează, sedimentul se examinează ulterior ca și coprocultura)



- **Serodiagnostic** (din II săptămână)

1. **RA Widal** - la diluții ale serului bolnavului se adaugă diagnosticuri OH din *S.Typhi*, *S.Paratyphi A* și *S.Paratyphi B*.

Titrul diagnostic 1/200 sau creșterea în dinamică a titrului.

2. **RA modificarea Felix** (utilizarea separată a diagnosticurilor O și H).

Anticorpilor anti-O (Ig M) apar primii (începând cu ziua 7-8) și dispar după 2-3 luni (maximum săpt. II-III).

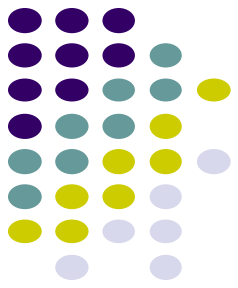
Anticorpilor anti-H (Ig M, apoi Ig G) apar mai târziu (10-12 zi) și persistă o durată mai lungă. În debut de reconvalescență (săptămâna a IV) titrul Ac anti-O și anti-H se egalează.

3. **RHAI** (cu diagnosticuri eritrocitare O)

4. **ELISA** detectează separat anticorpilor IgM și IgG contra unei proteine din membrana externă a *S.Typhi*.

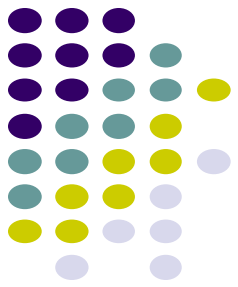


# INVESTIGAREA PURTĂTORILOR



- Coproculturi repetate
  - Urocultura
  - Bilicultura
  - Serodiagnostic
1. Reacția de **Vi-aglutinare** (eritrocite sensibilizate cu Ag Vi). Titrul diagnostic - 1/40
  2. Reacția de latex-aglutinare
  3. Determinarea izotipului de imunoglobuline **Ig G**

# TRATAMENTUL ȘI PROFILAXIA



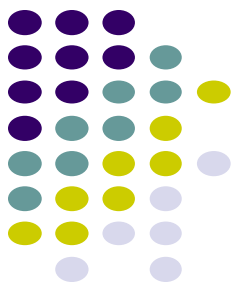
## Tratament:

- 📌 Fluorochinolone
- 📌 Cefalosporine de generația III
- 📌 Cloramfenicol
- 📌 Ampicilină
- 📌 Cotrimoxazol

**Antibiograma este obligatorie, tulpinile multirezistente sunt frecvente!!!**

**Profilaxia** specifică: vaccinarea selectivă (zone endemice, militari, personal medical, etc)

- 📌 Vaccin chimic **TABTe**
- 📌 Vaccin antitifoidic inactivat
- 📌 Vaccin atenuat **Ty21a** (administrare orală, imunitate locală sIgA), contraindicat gravidelor, copiilor, imunodeprimaților
  - **Vaccin subunitar din Ag Vi** (areactogen, imunitate 3-5 ani)

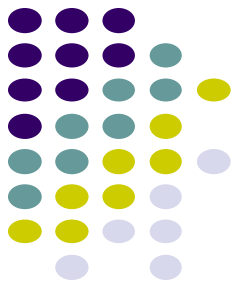


# SALMONELOZE DIGESTIVE

(gastro-enterite, toxi-infecții alimentare)

- Consecutive consumului de alimente contaminate cu salmonele (ouă, maioneză, patiserie cu cremă, carne, lactate, etc).
- Agenții cauzali: salmonele bipatogene  
Gr. **B** (S. Typhimurium, S. Paratyphi B, S. Heidelberg, S. Derbi)  
Gr. **C** (S. Choleraesuis, S. Newport, S. Paratyphi C)  
Gr. **D** (S. Enteritidis, S. Dublin)  
Gr. **E** (S. Anatum)

# PATOGENEZA GASTROENTERITELOR

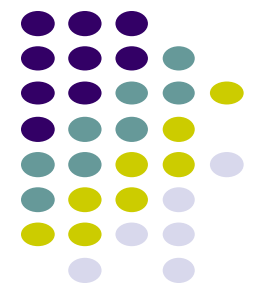
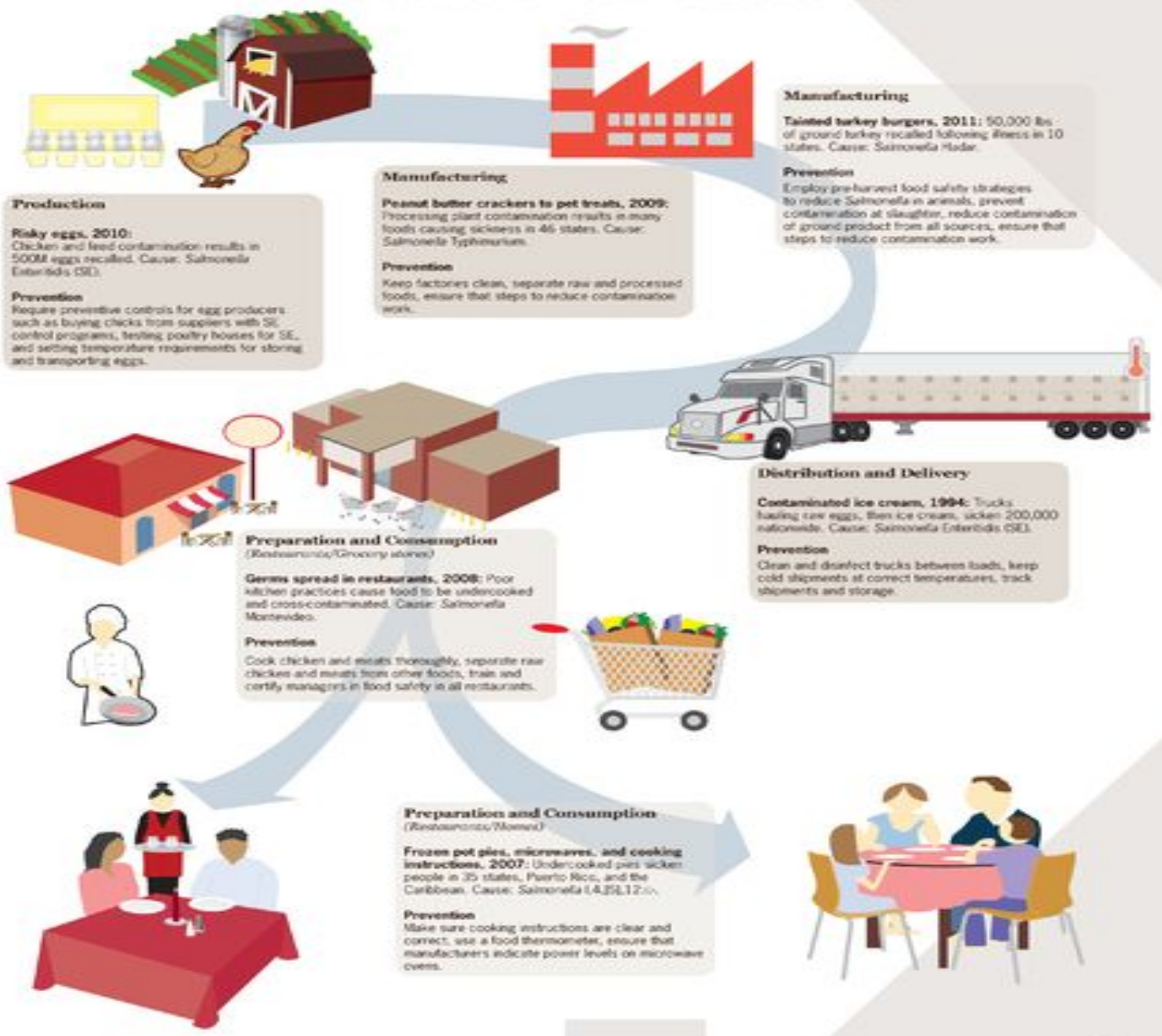


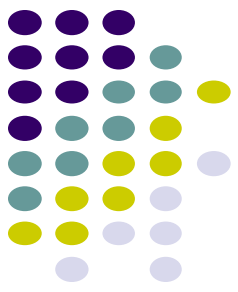
- **Sursa de infecție:** animalele domestice și păsările (bolnave sau purtători cronici), persoane bolnave sau purtători sănătoși de salmonele
- **Transmiterea** pe cale alimentară (alimente contaminate direct de la sursă sau pe parcursul procesului tehnologic), prin apă sau contact direct. Rareori prin inhalare de praf contaminat.
- **Doza infectantă** –în funcție de virulența tulpinii, receptivitatea gazdei, vârstă, utilizarea AB, concentrația inoculului, etc



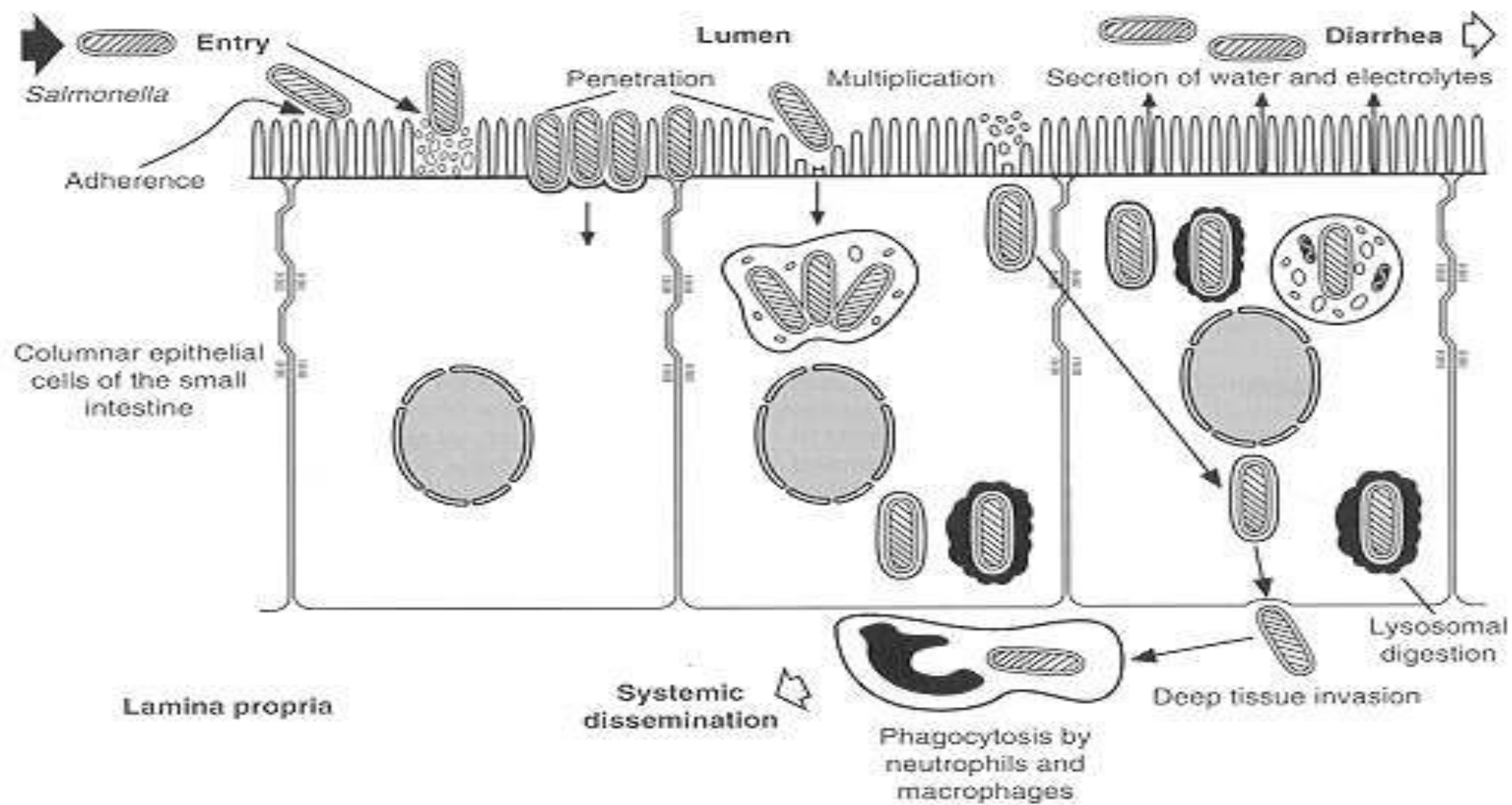
# Prevention from the Farm to the Table

## Lessons learned from *Salmonella* outbreaks

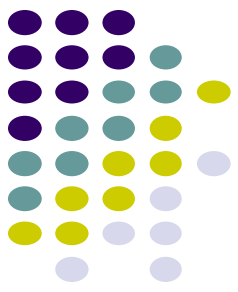




- Salmonelele depășesc aciditatea gastrică și ajung în intestinul subțire, unde aderă prin pili la suprafața celulelor M (preponderent) și a enterocitelor. Prin sisteme de secreție (tipul III) salmonelele injectează mai multe proteine, ceea ce determină endocitoza bacteriei cu transcitoza ulterioară de la suprafața apicală la membrana bazolaterală și invazia celulelor vecine. În interiorul celulei salmonelele se multiplică în vacuole, traversează celula și intră în *lamina propria*. Aici ele sunt fagocitate de neutrofile și macrofage și induc un răspuns inflamator profund. Persistența în *lamina propria* este asigurată de abilitatea salmonelelor de a ucide macrofagele prin multiple mecanisme, inclusiv prin inducerea apoptozei.
- Invazia și transcitoza enterocitelor, asociate cu permeabilitatea vasculară crescută și răspunsul inflamator determină diareea. Secreția de prostaglandine și factori chemotactici amplifică inflamația și modificările biochimice în enterocite.
- Gastroenteritele pot fi urmate de bacteriemii.





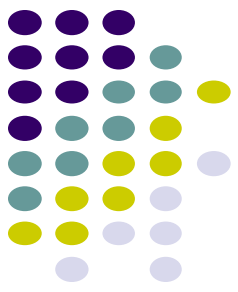


- **Manifestări clinice:**

Perioada de incubație – 8 - 48 ore

Debut brusc și evoluție acută (3 - 5 zile) cu diaree, vomă, febră, cefalee, stare de rău.

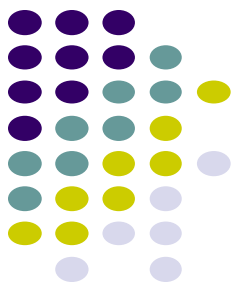
Evoluție severă – la sugari, bătrâni, imunodeprimați (în special bolnavi cu SIDA).



- **TOXIINFECȚII ALIMENTARE**

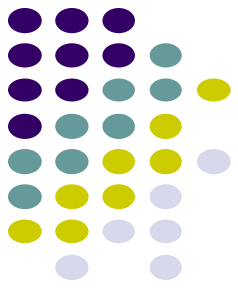
Survin ca urmare a ingestiei unui aliment în care s-au acumulat cantități mari de mi/o ( $10^5 - 10^7$ ). În stomac, apoi în intestin bacteriile se distrug, iar endotoxina eliberată provoacă semnele clinice de intoxicare.

**Alte forme de salmoneloze** (septicemii, meningite, infecții urinare, infecții nosocomiale, etc) se dezvoltă la persoane cu rezistența scăzută



## Diagnosticul de laborator al salmonelozelor non-tifoide

- **Prelevate:** în funcție de forma clinică - mase fecale, mase vomitive, sânge, spălături gastrice, urină, puroi, resturi de alimente suspecte.
- **Metode de diagnostic:**
  1. Examenul bacteriologic – de bază (coprocultură, hemocultură, urocultură...)
  2. RIF – pentru diagnostic rapid
  3. Serodiagnostic - RHAI



- **Profilaxia** salmonelozelor – nespecifică
- **Tratamentul**– simptomatic, antibioterapie la necesitate (copii mici, bătrâni, imunodeprimați, forme grave de infecție)