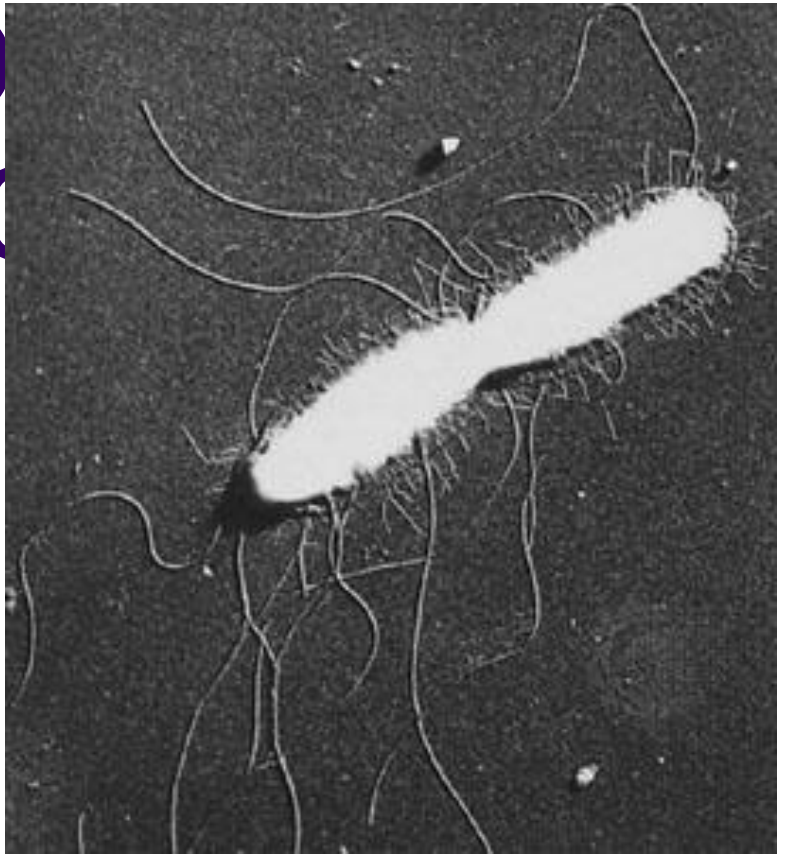
GENUL *SALMONELLA*. MICROBIOLOGIA ŞI DIAGNOSTICUL DE LABO AL SALMONELOZELO



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%) aparţin *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 varietăţi antigenice (O_1, O_2, O_3, ... O_{65}, etc), permite repartizarea salmonelelor în serogrupe (A, B, C, D, E,...Z, O_{51},...)

Fracţii antigenice majore desemnează grupa:

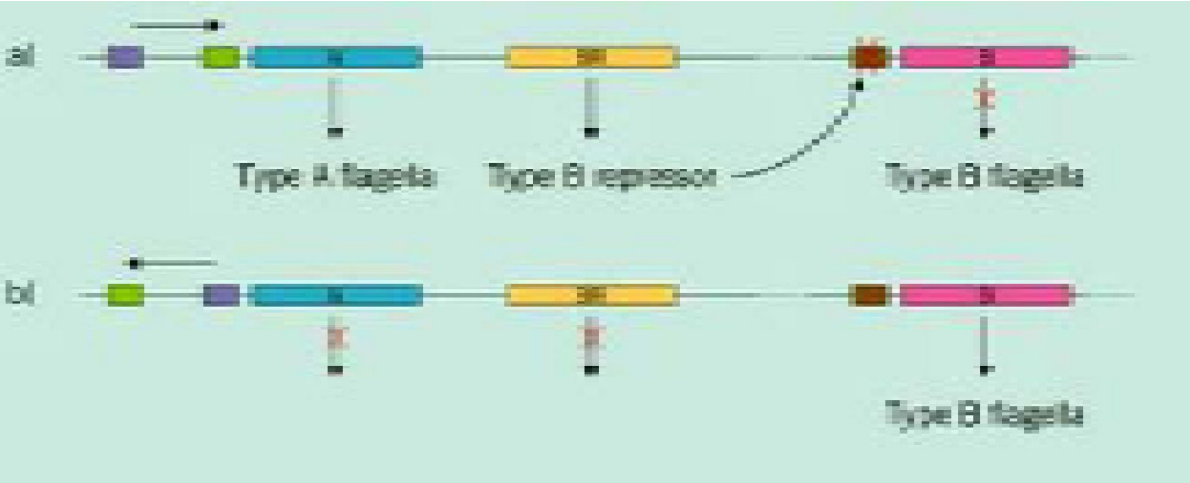
O_2 – grupa **A**; O_4 – **B**, O_6 – **C**, O_9 – **D**, etc

Fracţii antigenice minore – **O_1, O_{12}** - sunt comune

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

Ag H faza 1– Ha; Hb; Hc; Hd; Hg,m...

Ag H faza 2– $H_{1,2}$; $H_{1,5}$; $H_{1,7}$;...



Serovar monofazic: $O_{1,2,12}$:H_a (*S*.Paratyphi A)

Serovar difazic: $O_{1,4,12}$:$H_bH_{1,2}$ (*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 – $O_{9,12}$:H_d:Vi+ / $O_{9,12}$:H_d:Vi-

Conform patogenităţii pentru gazdă se disting:

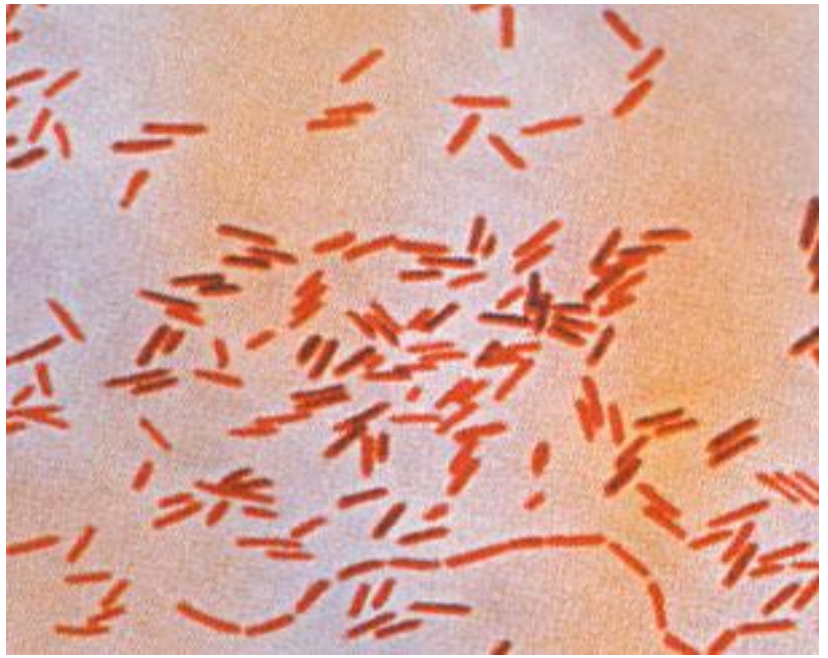
I. Salmonele monopatogene (umane) (S.Typhi, *S*.Paratyphi A, *S*.Paratyphi B)

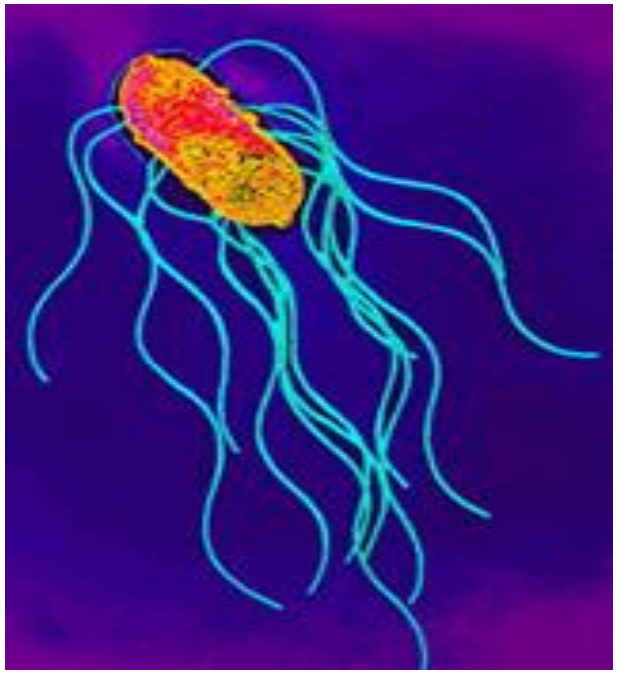
II. Salmonele bipatogene (patogene pentru om şi animale, ubicvitare) – majoritatea.

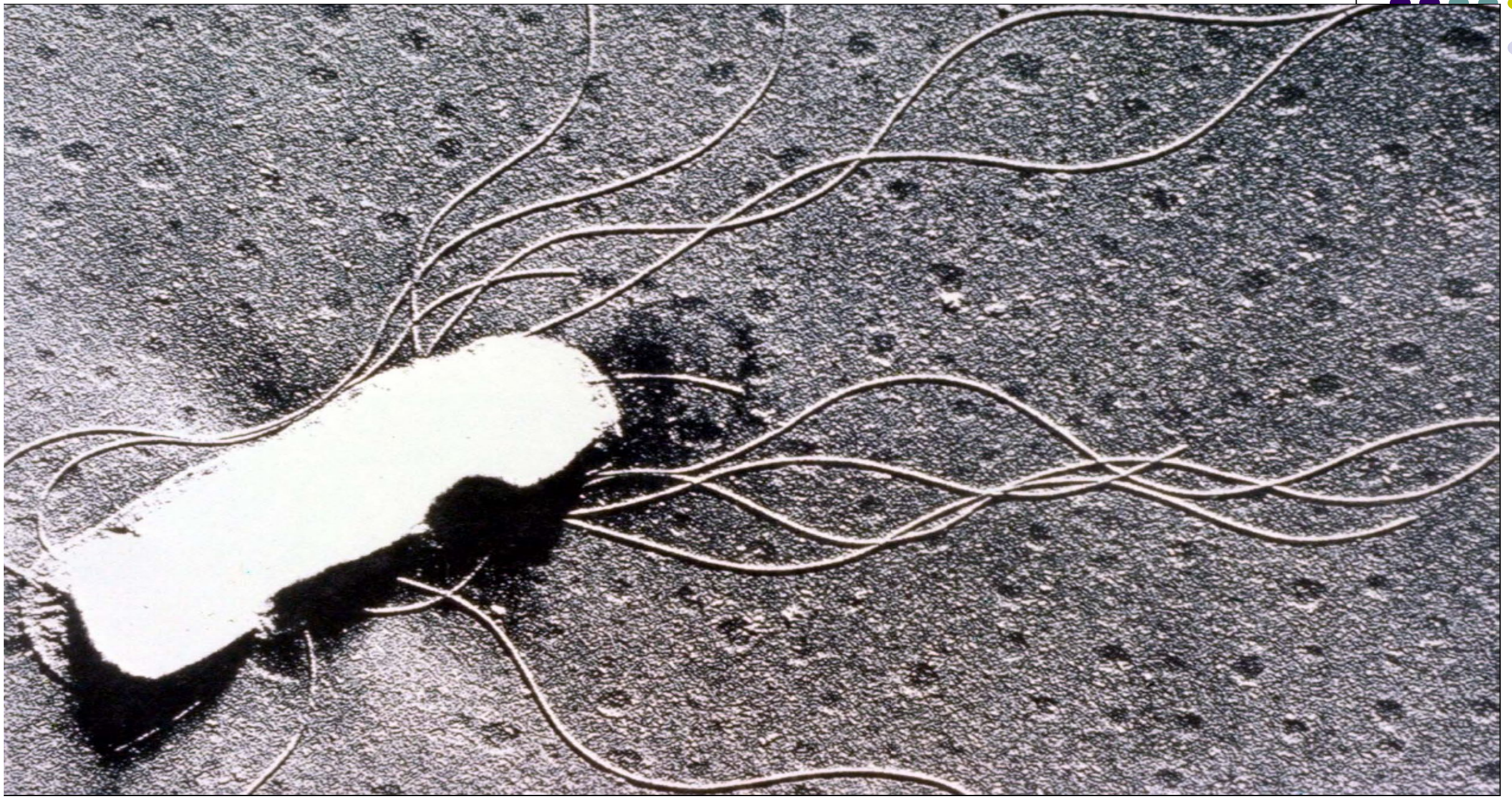
Grupa	Serovarul	Antigenul O	Vi	Antigene H faza 1	faza 2
A	Paratyphi A	1,2,12		a	–
B	Paratyphi B	1,4,5,12		b	1,2
	Wien	1,4,12,27		b	l,w
	Typhimurium	1,4,5,12		i	1,2
	Derby	1,4,12		f,g	–
C	Paratyphi C	6,7	+	c	1,5
	Virchov	6,7		r	1,2
	Infantis	6,7		r	1,5
	Bovismorbificans	6,8		r	1,5
D	Typhi	9,12	+	d	–
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

Caractere morfologice

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







- **Caractere de cultură**

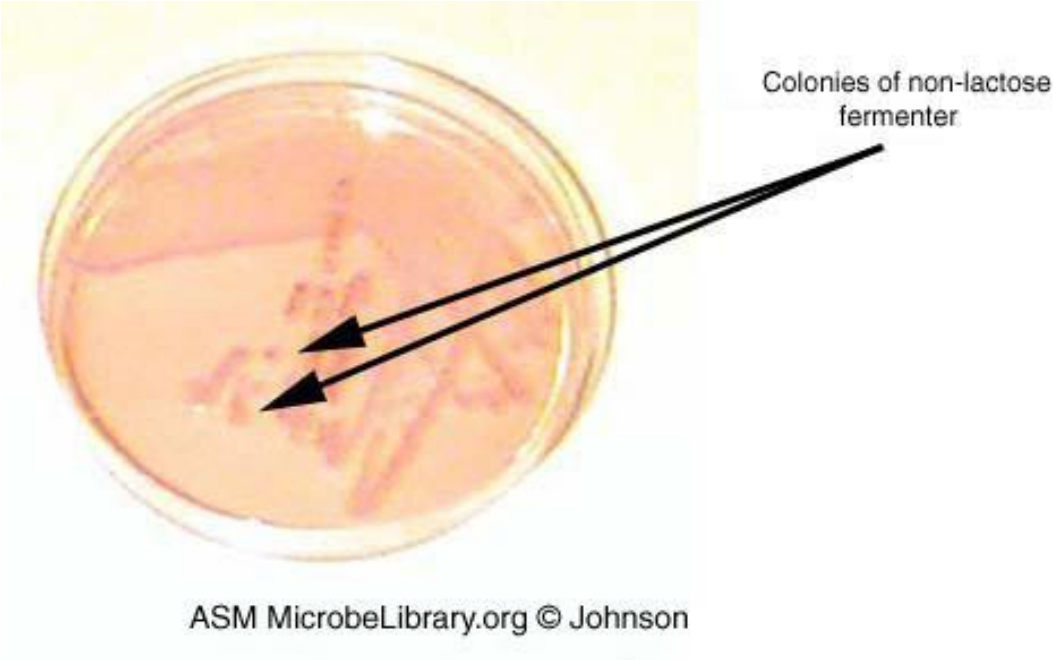
1. Medii de îmbogăţire : Muller, Kauffman (medii cu bilă, tetrationat de Na), bulion cu selenit de Na
2. Medii DD de izolare a culturii pure: Endo, Levin, Ploskirev, SS (colonii S, lactozo -); mediul Wilson-Blair cu sulfit de bismut (colonii negre)
3. Medii DD de acumulare şi diferenţiere: Olkeniţki, Kligler (glucoza A/AG, lactoza-, H_2S+, ureaza-)

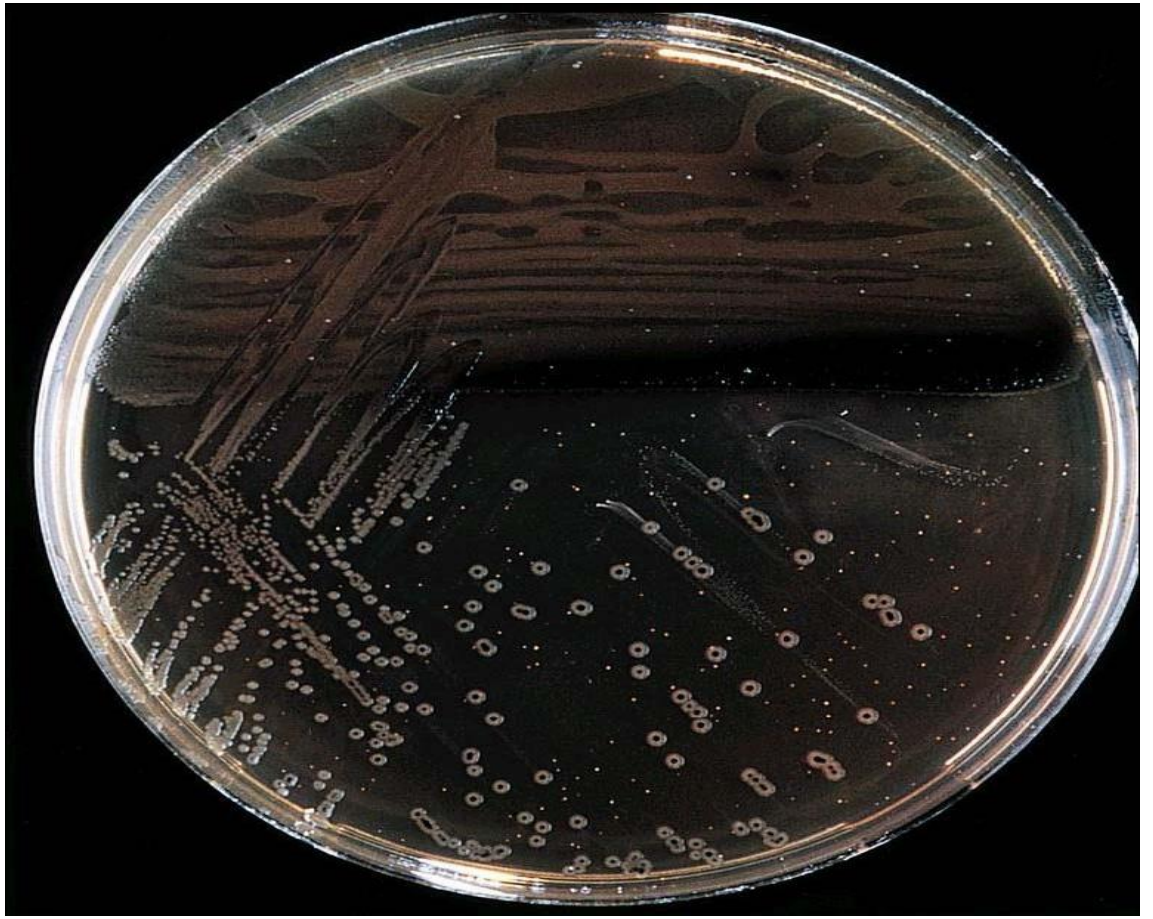
Teste primare: utilizează citratul de Na, produc H_2S, MR+, LDC+, mobilitate+, celelalte teste – negative.

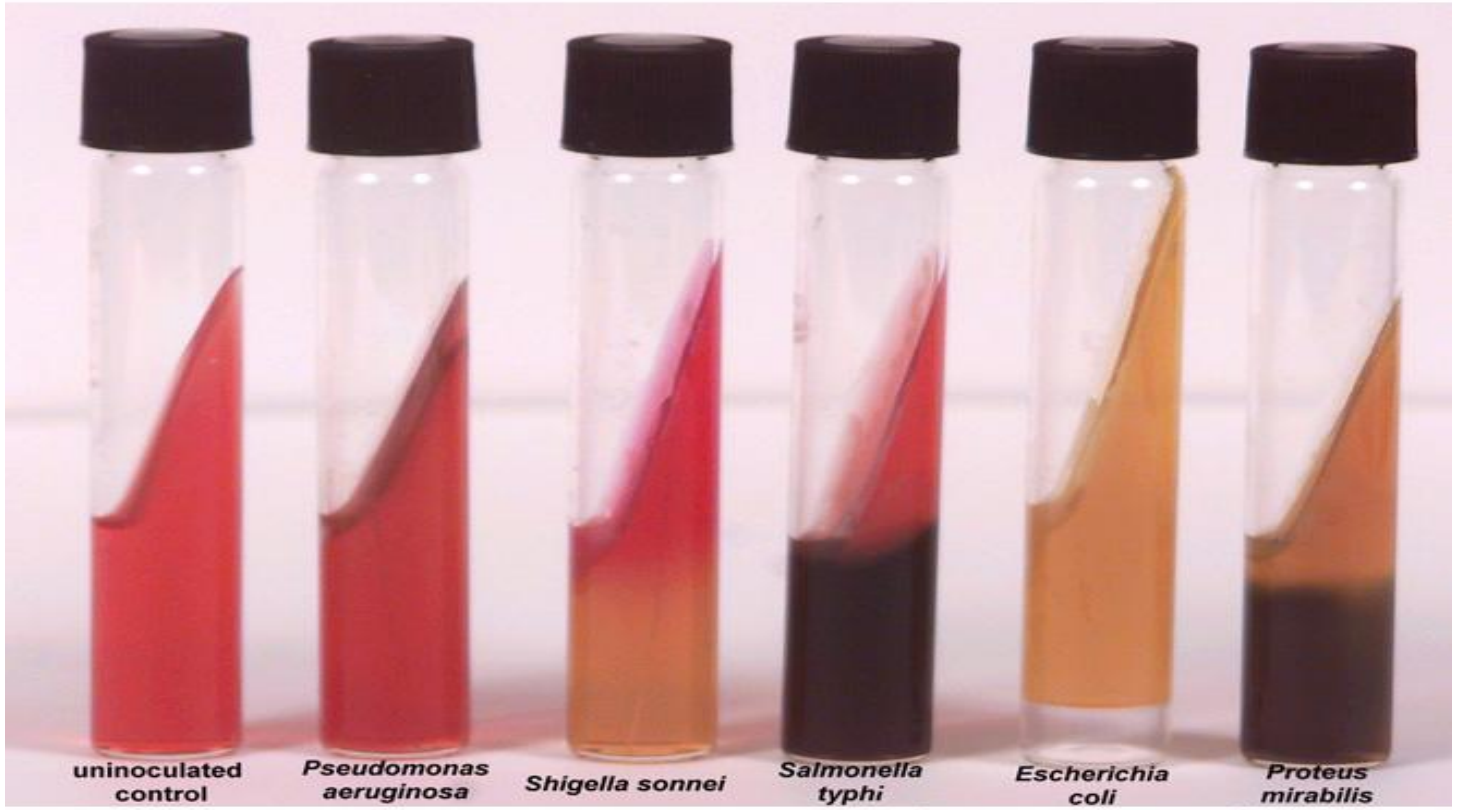
Teste secundare: scindează glucidele A/AG, indol-, ornitindecarboxilaza+, etc

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

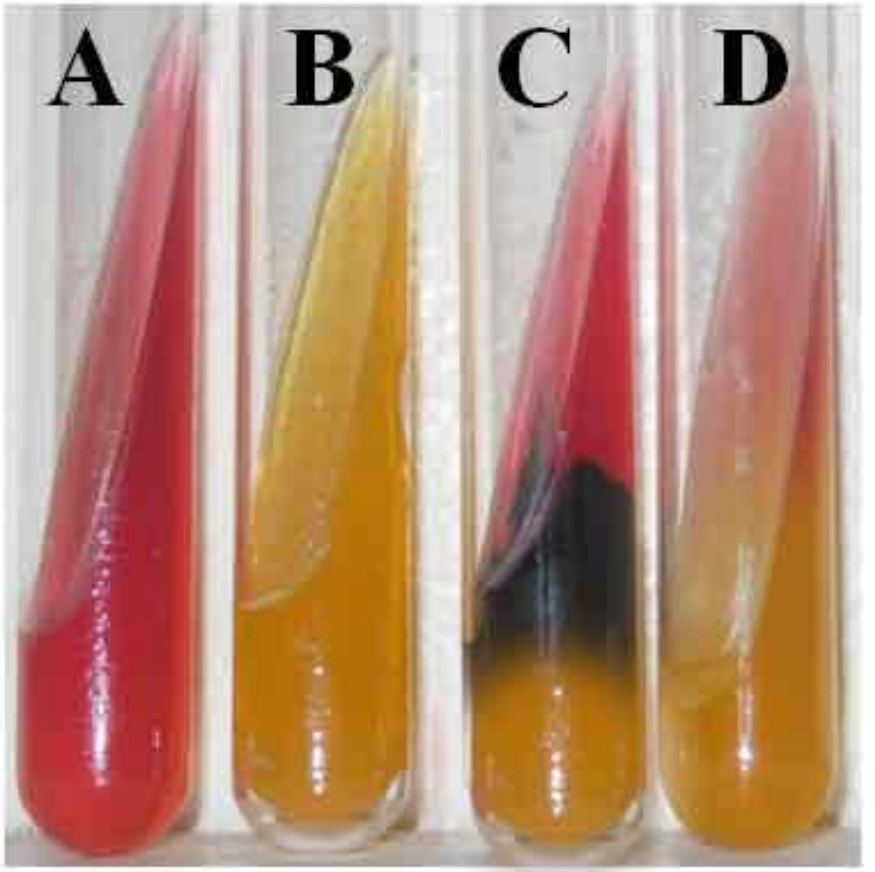
*S.*Paratyphi A – H_2S+/-, LDC-


Colonies of non-lactose fermenter
ASM MicrobeLibrary.org © Johnson





ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain



A) ***Psuedomonas aeroginosa*:** Gluc (-), Lac/Suc (-), H_2S (-)

B) ***Escherichia coli*:** Gluc (+), Lac/Suc (+), H_2S (-)

C) ***Salmonella typhimurium*:** Gluc (+), Lac/Suc (-), H_2S (+)

D) ***Shigella boydii*:** Gluc (+), Lac/Suc (-), H_2S (-)

FACTORI DE PATOGENITATE

- Fimbrii (adeziune)
- Capacitatea de a penetra în celule (sistem de secretie III) şi 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, rezistenţă la activitatea bactericidă a serului)

- Majoritatea salmonelelor (98%) sunt sensibile la bacteriofagul O1. Există bacteriofagi cu specificitate de specie şi variantă.

- **Habitat:** intestinul omului, animalelor, păsărilor, reptilelor. Vertebratele acvatice (păsări, reptile), păsările domestice, bovinele, ovinele, porcinele, etc sunt frecvent contaminate (carne, ouă)
- **Rezistenţa în mediul extern**: salmonelele rezistă la 70°C 30 min., rezistente la frig şi concentraţii mari de sare. Supravieţuesc mai multe săptămâni în mediu sec şi luni în apă. Se înmulţesc în produse alimentare la temperatura camerei.

ROLUL SALMONELELOR ÎN PATOLOGIA UMANĂ

- SALMONELOZE:

I. **Febre tifo-paratifoide**

II. **Salmoneloze digestive** (toxi-infecţii alimentare, gastro-enterite)

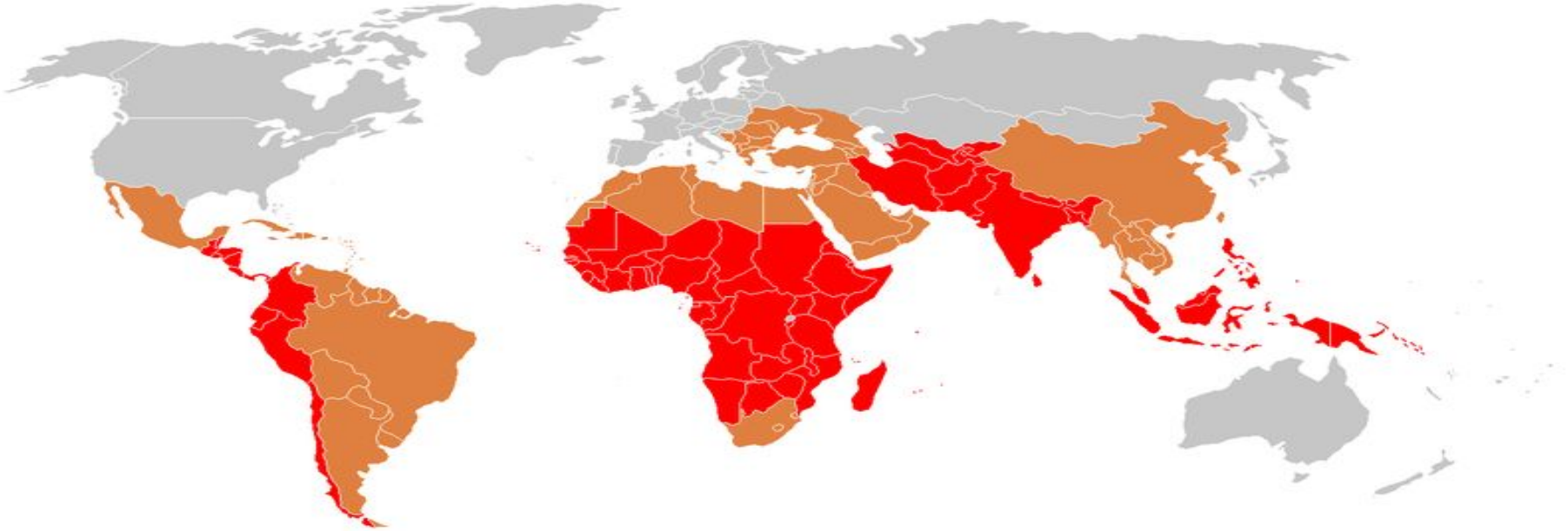
III. **Manifestări extra-digestive**:

- bacteriemii nontifoidice
- infecţii pleuro-pulmonare
- afecţiuni osteo-articulare (osteite, osteomielite, artrite septice, etc)
- infecţii nozocomiale
- infecţii cardio-vasculare (pericardită, arterite)
- infecţii urinare
- infecţii abdominale (colecistită, abces al ficatului, splinei)
- infecţii ale SNC (meningită, abces al creierului, abces epidural, etc)

FEBRELE TIFO-PARATIFOIDE

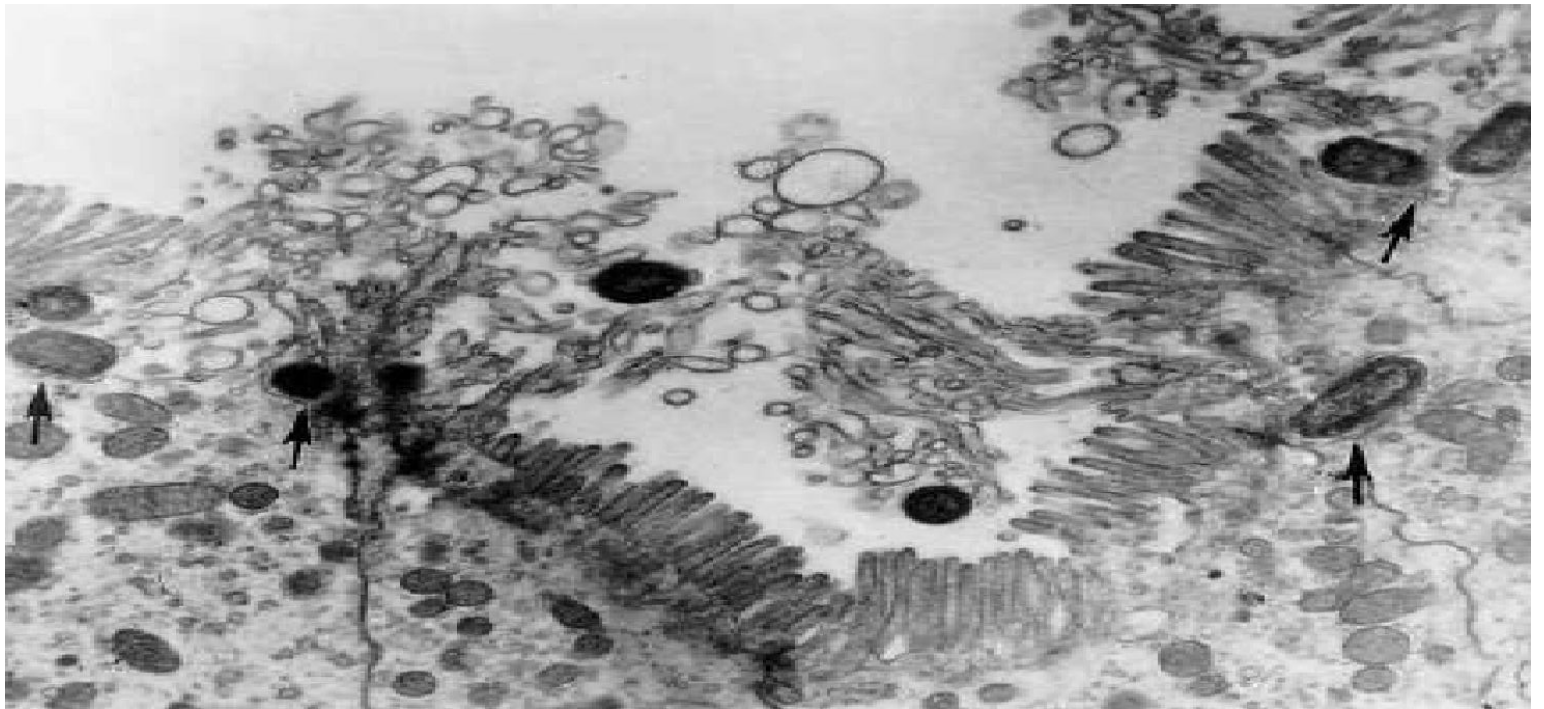
- Agenţii cauzali – *S.*Typhi, *S.*Paratyphi A, B, (C)
- Sursa de infecţie – omul bolnav, purtătorul
- Contaminarea fecal-orală (apă, alimente), contact direct
- Doza infectantă – 10^5 - 10^6 bacterii

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



PATOGENEZA

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



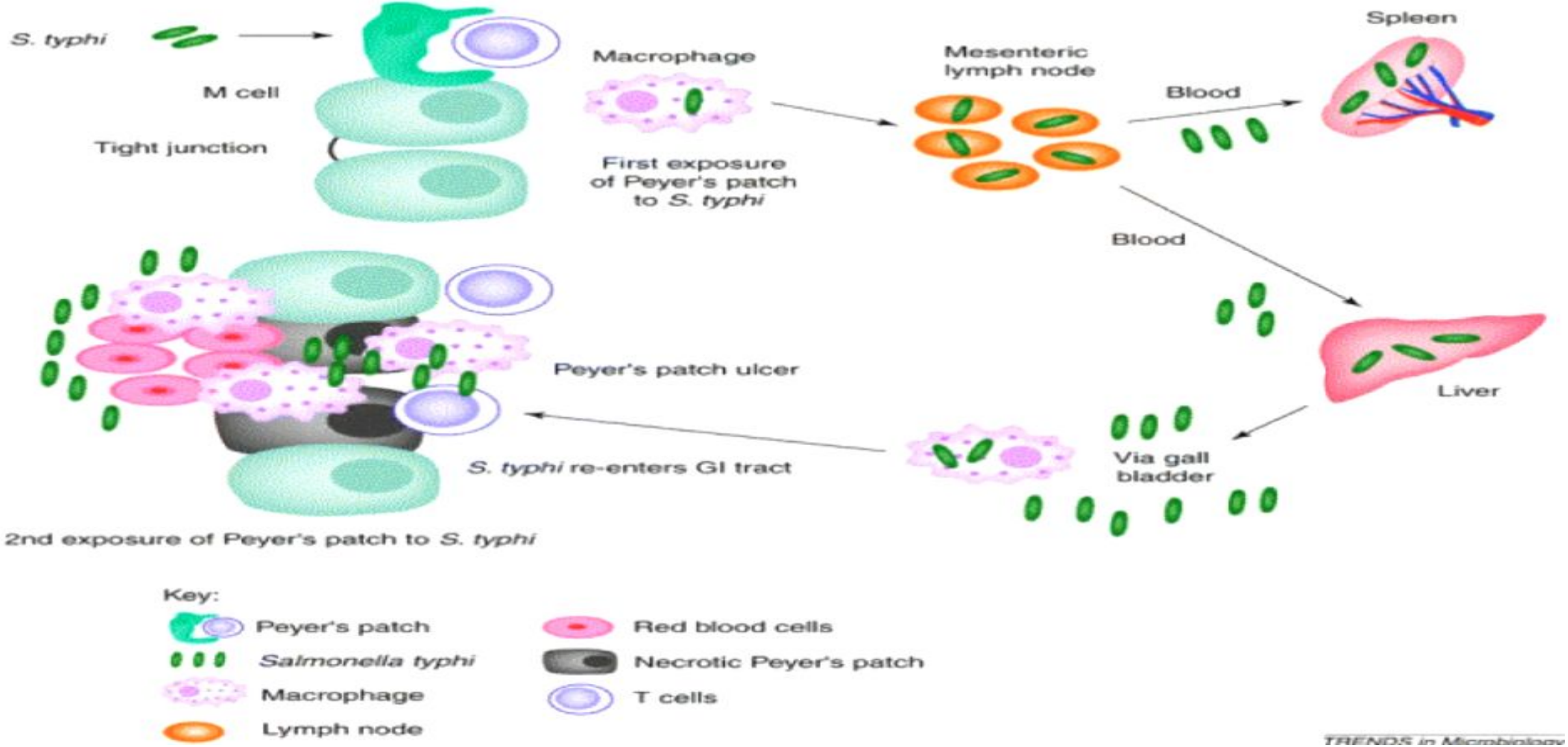
I săptămână de boală (bacteriemie). Invadarea fluxului sangvin via sistemul limfatic (diseminarea germenilor) cu eliberarea endotoxinei. Endotoxina pe cale sangvină parvine la centrii neurovegetativi ai ventriculului 3, determinând febră, stare de tifos, colaps cardio-vascular, etc.

II săptămână de boală (difuzie parenchimatoasă)

Bacteriile sunt fixate în organele SRE şi se multiplică în ficat, splină, măduvă osoasă, ţesut 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 iarăşi în intestin. La nivelul plăcilor Peyer se dezvoltă o reacţie de hipersensibilitate tip 4 - necroză, *ulceraţii*

S. Typhi Pathogenesis



- **Manifestări clinice**

I. Perioada de incubaţie - 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, somnolenţă, posibil comă. Erupţii cutanate (rozeole) apar pe abdomen, torace, spate în ziua a 8-9 de boală (embolii limfatice cu bacterii). Constipaţie, uneori diaree, tulburări cardiovasculare.
Complicaţii: hemoragii intestinale, perforarea intestinului, peritonită, miocardită, meningită, psihoză etc.

IV. Perioada de reconvalescenţă (1-3-6 luni)

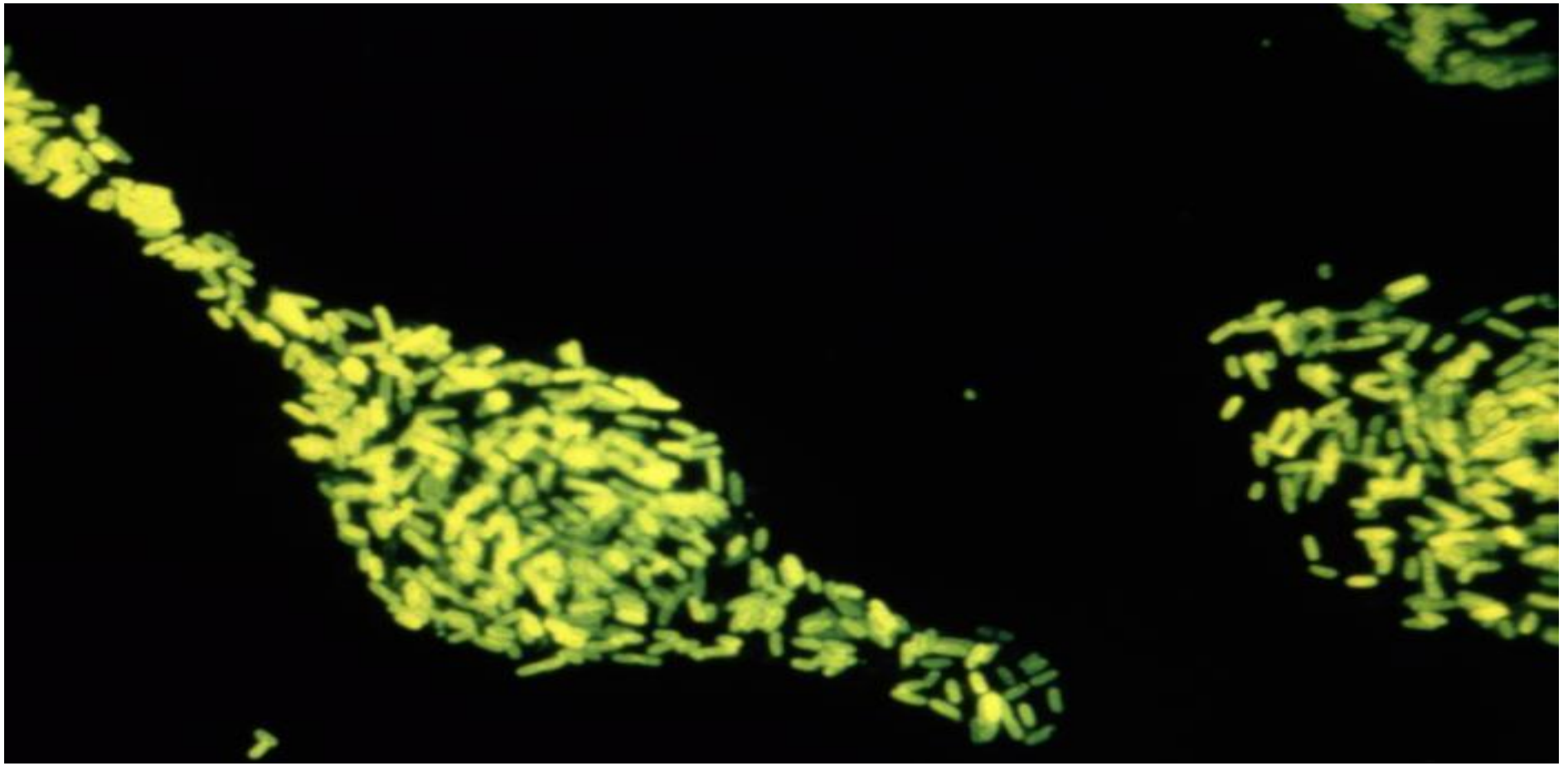
- **Imunitatea** – celulară, umorală
- 5-10% convalescenţi – purtători până la 3 luni (cu depistarea salmonelelor în bilă sau/şi urină)
- 3-5% convalescenţi (cu litiază biliară) – purtători cronici– (1-10 ani – toată viaţa)
- **Recidive** sunt posibile (descărcări bacteriemice din focare profunde, forme L), se caracterizează prin simptome atenuate şi evoluţie 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 insămânţează în 100 ml bulion biliat, mediul Rappoport, bulion glucozat 1% sau mediu bifazic pentru *îmbogăţirea salmonelelor*. Se incubează la 37 grade şi în zilele 1, 2, 3, 5, 7 şi 10 se repică pe un mediu DD (Endo, Levin, Ploskirev, W-B) pentru *izolarea culturii pure*. Coloniile lactozo- se repică pe mediul Kligler (Olkeniţki) pentru *acumularea culturii pure şi 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 (O2, O4, O6, O9, 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- şi bilicultura se examinează ca şi hemocultura

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

- **Serodiagnostic** (din II săptămână)

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

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

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

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

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

3. RHAI (cu diagnosticuri eritrocitare O)

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

INVESTIGAREA PURTĂTORILOR

- Coproculturi repetate
- Urocultura
- Bilicultura
- Serodiagnostic

1. Reacţia de **Vi-aglutinare** (eritrocite sensibilizate cu Ag Vi). Titrul diagnostic - 1/40
2. Reacţia de latex-aglutinare
3. Determinarea izotipului de imunoglobuline **Ig G**

TRATAMENTUL ŞI PROFILAXIA

Tratament:

- Fluorochinolone
- Cefalosporine de generaţia 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, imunodeprimaţilor

- **Vaccin subunitar din Ag Vi** (areactogen, imunitate 3-5 ani)

SALMONELOZE DIGESTIVE
(gastro-enterite, toxi-infecţii alimentare)

- Consecutive consumului de alimente contaminate cu salmonele (ouă, maioneză, patiserie cu cremă, carne, lactate, etc).
- Agenţii 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 infecţie**: animalele domestice şi 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 funcţie de virulenţa tulpinii, receptivitatea gazdei, vârstă, utilizarea AB, concentraţia inoculului, etc

Prevention from the Farm to the Table

Lessons learned from *Salmonella* outbreaks

Production

Risky eggs, 2010: Chicken and feed contamination results in 500M eggs recalled. Cause: *Salmonella* Enteritidis (SE).

Prevention
Require preventive controls for egg producers such as buying chicks from suppliers with SE control programs, testing poultry houses for SE, and setting temperature requirements for storing and transporting eggs.

Manufacturing

Peanut butter crackers to pet treats, 2009: Processing plant contamination results in many foods causing sickness in 46 states. Cause: *Salmonella* Typhimurium.

Prevention
Keep factories clean, separate raw and processed foods, ensure that steps to reduce contamination work.

Manufacturing

Tainted turkey burgers, 2011: 90,000 lbs of ground turkey recalled following illness in 10 states. Cause: *Salmonella* Hadar.

Prevention
Employ pre-harvest food safety strategies to reduce *Salmonella* in animals, prevent contamination at slaughter, reduce contamination of ground product from all sources, ensure that steps to reduce contamination work.

Distribution and Delivery

Contaminated ice cream, 1994: Trucks hauling raw eggs, then ice cream, sicken 200,000 nationwide. Cause: *Salmonella* Enteritidis (SE).

Prevention
Clean and disinfect trucks between loads, keep cold shipments at correct temperatures, track shipments and storage.

Preparation and Consumption
(Restaurants/Grocery stores)

Germs spread in restaurants, 2008: Poor kitchen practices cause food to be undercooked and cross-contaminated. Cause: *Salmonella* Montevideo.

Prevention
Cook chicken and meats thoroughly, separate raw chicken and meats from other foods, train and certify managers in food safety in all restaurants.

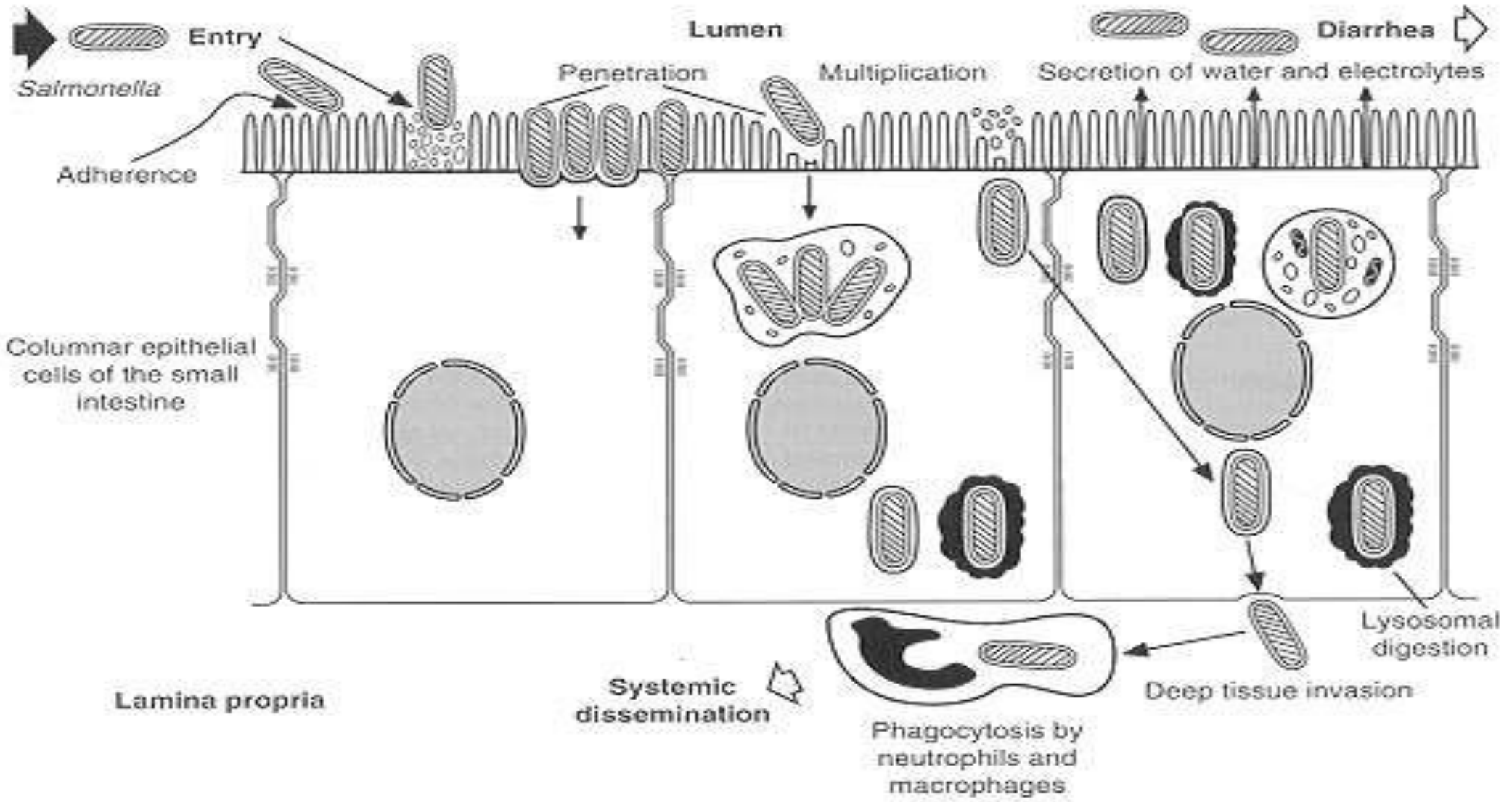
Preparation and Consumption
(Restaurants/Homes)

Frozen pot pies, microwaves, and cooking instructions, 2007: Undercooked pies sicken people in 35 states, Puerto Rico, and the Caribbean. Cause: *Salmonella* (4,[5],12:i:-).

Prevention
Make sure cooking instructions are clear and correct, use a food thermometer, ensure that manufacturers indicate power levels on microwave ovens.

Source: CDC, 2010.

- 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.


Entry
Salmonella
Lumen
Penetration
Multiplication
Secretion of water and electrolytes
Diarrhea
Adherence
Columnar epithelial cells of the small intestine
Lysosomal digestion
Deep tissue invasion
Lamina propria
Systemic dissemination
Phagocytosis by neutrophils and macrophages

- **Manifestări clinice:**

Perioada de incubaţie – 8 - 48 ore

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

Evoluţie severă – la sugari, bătrâni, imunodeprimaţi (în special bolnavi cu SIDA).

- TOXIINFECŢII ALIMENTARE

Survin ca urmare a ingestiei unui aliment în care s-au acumulat cantităţi 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, infecţii urinare, infecţii nosocomiale, etc) se dezvoltă la persoane cu rezistenţa scăzută

Diagnosticul de laborator al salmonelozelor non-tifoide

- **Prelevate:** în funcţie 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, imunodeprimaţi, forme grave de infecţie)