***Salmonella enterica enterica* y *Salmonella enterica diarizonae* aisladas de ofidios en el Parque Zoológico de La Plata, Argentina.**

Vigo G.^{1*}, Caffer M.², Origlia J.³, Carriquiriborde M.⁴, Leotta G.^{5,6}

1. Cátedra de Microbiología, 3. Cátedra de Patología Aviar y Pílferos,
4. Cátedra de Animales de Laboratorio, 5. Cátedra de Tecnología de los Alimentos,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, 1900, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
2. Servicio Enterobacterias, Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán",
1281 Buenos Aires, Argentina
6. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
*Correo electrónico: gvigo@fcv.unlp.edu.ar

No existe conflicto de intereses.

Palabras clave

Salmonella enterica, *Salmonella diarizonae*, Serovares, Antimicrobianos, Víboras.

RESUMEN

La salmonelosis es reconocida por ser una de las más importantes causas de problemas de Salud Pública a nivel mundial. En el presente estudio, *Salmonella* fue aislada de 12 de 30 (40%) muestras de hisopados cloacales de víboras. Se encontraron un total de ocho diferentes serovares de *Salmonella*. Los aislamientos correspondieron al género *Salmonella*, especie *enterica*, subespecie *enterica* (42%, *Salmonella* Newport, Saintpaul y Carrau) y *Salmonella enterica diarizonae* (58%, IIIb 17:-:-, IIIb 48:i:z. IIIb 38:z:- y IIIb 65:k:z). Todos los aislamientos fueron susceptibles a los antimicrobianos utilizados: ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomycin, sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, ciprofloxacina, norfloxacina, nitrofurantoina, fosfomicina y polimixina. Las víboras pueden ser una fuente de salmonelosis para los humanos. Existen pocos estudios sobre *Salmonella* realizados en víboras en parques zoológicos en Latinoamérica. Este es el primer informe sobre este tipo de relevamiento realizado en víboras de zoológico en la República Argentina.

Keywords

Salmonella enterica, *Salmonella diarizonae*, Serovars, Antimicrobials, Snakes.

SUMMARY

***Salmonella enterica* sv. *Enterica* and *Salmonella enterica* sv. *Diarizonae* isolated from ophidia at La Plata Zoological Park, Argentina.**

Salmonellosis is known to be one of the most important causes of public health problems worldwide. In the present study, *Salmonella* was isolated from 12 of 30 (40%) fecal swabs of snakes. A total of eight different *Salmonella* serovars were found. The isolates belonged to genus *Salmonella*, species *enterica*, subspecies *enterica* (42%, *Salmonella* Newport, Saintpaul and Carrau) and *Salmonella enterica diarizonae* (58%, IIIb 17:-:-, IIIb 48:i:z, IIIb 65:-:-, IIIb 38:Z:- and IIIb 65:k:z). All isolates were sensitives to the antimicrobials tested: ampicillin, cefalotin, chloramphenicol, gentamicin, streptomycin, trimethoprim-sulphamethoxazole, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, nitrofurantoin, fosfomycin and polimixin. Snakes can be a source of human salmonellosis. There are few *Salmonella* studies from snakes performed in zoological parks in Latin America. This is the first report about this type of survey performed in snakes of a zoological garden in the Argentine Republic.

Introducción

La salmonelosis es uno de los más importantes problemas de Salud Pública, afectando más seres humanos y animales que cualquier otra enfermedad¹¹. *Salmonella* spp. habita el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados en el mundo entero y su excreción resulta en la contaminación del agua, alimento, y el medio ambiente^{23,24}. Reptiles silvestres y domesticados son reservorios de *Salmonella*^{3,5,13,18}. Una gran variedad de serovares de *Salmonella* de todas las subespecies han sido aislados de reptiles, muchos de los cuales representan serovares raros o también denominados exóticos³. Últimamente, el

número de reptiles exóticos se ha incrementado en popularidad al ser utilizados como mascotas y este hecho, ha llevado a provocar un incremento en el número de infecciones por *Salmonella* asociado a reptiles en los Estados Unidos¹⁸ y en países europeos¹. Aunque diferentes reptiles, tales como iguanas, tortugas y víboras fueron descriptos como fuente de salmonelosis humana, sin embargo, no está determinado con qué frecuencia ciertas especies de víboras son colonizadas por especies de *Salmonella*^{5,10,22}. Los objetivos de este trabajo fueron investigar diferentes especies de víboras en el Parque Zoológico de La Plata para determinar la presencia de *Salmonella* spp., identificar los aislamientos mediante prue-

bas bioquímicas y serología, y determinar sus susceptibilidades a diferentes antimicrobianos.

Materiales y métodos

Las muestras fueron recolectadas en el año 2004 en el Parque Zoológico y Botánico de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Fueron muestreadas 30 víboras aparentemente sanas pertenecientes a tres Familias y siete Géneros distribuidos en nueve hábitats. Las víboras estaban alojadas individualmente o en grupos en cajas de vidrio, cemento o madera con piso de cemento, pasto sintético, tierra, arena u

hojas muertas. Los animales fueron alimentados con ratones, ratas o cobayos provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP. Los animales fueron muestreados mediante hisopados cloacales, los cuales fueron colocados en medio de transporte de Stuart (Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina) e inmediatamente transportados al laboratorio. Las muestras fueron inoculadas en 10 ml de agua peptonada taponada (APT) (Laboratorios Britania S.A.) e incubadas a 37°C por 24 horas. Luego, 1 ml. del APT fue transferido a 10 ml. de caldo tetrationato (Laboratorios Britania S.A.) e incubado a 37°C por 20-24 horas. Luego, una ansada del caldo de enriquecimiento fue estriada en una placa de agar entérico hektoen (laboratorios Britania S.A.) con el agregado de novobiocina (10µg/ml) (ICN Biomedicals, Ohio, USA). Esta metodología fue la utilizada en una publicación anterior²¹. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24-48 horas. Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* (5 por cada placa) fueron subcultivadas para realizarles las pruebas bioquímicas. *Salmonella spp.* fue confirmada por pruebas bioquímicas convencionales⁹. Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron las siguientes: S. e. e.: indol: -, rojo de metilo: +,

Voges-Proskauer: -, citrato: + Urea: - (S. Carrau: +), lisina: +, ornitina: +, malonato: -, glucosa: +, lactosa: -, manitol: +, dulcitol: +, salicina: -, adonitol: -, producción de sulfito de hidrógeno (TSI): +, tartrato de Jordan's: +, fermentación del mucato: +. S. e. d: indol: -, rojo de metilo: +, Voges-Proskauer: -, citrato: +, urea: -, lisina: +, ornitina: +, malonato: +, glucosa: +, lactosa: +, manitol: +, dulcitol: -, salicina: -, adonitol: -, producción de sulfito de hidrógeno (TSI): +, tartrato de Jordan's: -, fermentación del mucato: -. Los medios de cultivo utilizados fueron de laboratorios Britania y los hidratos de carbono y reactivos de Sigma Chemical CO, St Louis, USA. Los aislamientos fueron serotipificados con antiseros polivalentes y específicos O y H de acuerdo al método de Popoff y Le Minor¹⁵, Popoff¹⁶ en el Instituto INEI-ANLIS "Dr. C.G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina y los aislamientos de *S. e. diarizonae* fueron determinados en el National Microbiology Laboratory, Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Canada, e identificadas de acuerdo al esquema de Popoff¹⁶. El método de difusión en disco, según normas del Clinical and Laboratory Standards Institute⁴, fue utilizado para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de todos los aisla-

mientos de *Salmonella spp.* Los antimicrobianos (Laboratorios Britania S.A.) empleados y sus concentraciones fueron los siguientes: ampicilina (30 µg), cefalotina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), estreptomina (10 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (23,15-1,25 µg), tetraciclina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), nitrofurantoina (300 µg), fosfomicina (50 µg) y polimixina (300 U).

Resultados

S. enterica fue aislada de 12 de 30 víboras (40%), 7 (58%) de las cuales pertenecieron a *S. e. diarizonae* y 5 (42%) pertenecieron a *S. e. enterica*. Fueron encontrados ocho diferentes serovares: IIIb 17:-:- (en *Boa constrictor constrictor*), IIIb 48:i,z (en *Boa constrictor occidentalis* e *Hydrodinastes gigas*), IIIb 65:-:- (en *Epicrates cenchria*), IIIb 38:z:- (en *Python regius*), IIIb 65:k:z (en *Clelia rustica*), S. Carrau (en *Hydrodinastes gigas*), S. Newport (en *Epicrates cenchria*) y S. Saintpaul (en *Bothrops alternatus*) (Tabla 1). Todos los aislamientos fueron susceptibles a todos los antimicrobianos utilizados en el estudio.

Tabla 1.
Origen e identificación de los aislamientos realizados.

Familia	Nombre común	Nombre científico	Muestras positivas/total (%)	Cajas	Subespecies y serovares de <i>Salmonella</i>
Boidae	Boa constrictora	<i>Boa constrictor constrictor</i>	1/1 (100 %)	A	IIIb 17:-:-
Boidae	Boa lampalagua	<i>Boa constrictor occidentalis</i>	1/10 (10 %)	B	IIIb 48:i:z
Crotalidae	Yarará grande	<i>Bothrops alternatus</i>	1/1 (100 %)	C	S. Saintpaul
Boidae	Boa arco iris	<i>Epicrates cenchria</i>	2/5 (40%)	D	S. Newport; IIIb 65:-:-
Boidae	Pitón bola	<i>Python regius</i>	1/1 (100%)	E	IIIb 38:z:-
Colubridae	Culebra marrón	<i>Clelia rustica</i>	2/2 (100 %)	F	IIIb 65:k:z (2)
Colubridae	Ñacanina	<i>Hydrodinastes gigas</i>	4/7 (57 %)	G	S. Carrau (3); IIIb 48:i:z
Colubridae	Musaraña	<i>Clelia clelia</i>	0/1 (0%)	H	
Colubridae	Culebra verde	<i>Phylodrias baroni</i>	0/2 (0%)	I	
TOTAL			12/30 (40%)		

Discusión

Los reptiles cautivos son identificados como reservorios de *Salmonella* spp. En este trabajo, se halló una alta proporción de muestras positivas (40%). El porcentaje de *Salmonella* encontrado en víboras en este estudio, está en concordancia con los resultados de otros investigadores^{7,10,11,18}. Todos los aislamientos pertenecieron a *S. enterica*, subespecie *enterica* y a *S. e. diarizonae*. *S. e. e.* serovar Saintpaul, Newport y Carrau aisladas en este estudio, son patógenos para humanos y animales, y también fueron identificados en reptiles salvajes o cautivos^{7,11,12}. *S. Carrau* se encuentra asociada a reptiles, que son la fuente de infección de este serovar para los humanos, habiéndose incrementado el número de aislamientos de *S. Carrau* desde 1987 hasta 1997 en USA y fue incluido como uno de los 20 serovares que se incrementaron durante este período², atribuyéndose este fenómeno a la moda de poseer reptiles como mascotas en este país. Los tres aislamientos de *S. Carrau* fueron urea positivos, lo que es una característica bioquímica inusual para *Salmonella* spp., mientras que el resto de las reacciones bioquímicas y serológicas dieron resultados típicos. La identificación de *S. Carrau* urea positiva podría ser un problema para los laboratorios que realizan la combinación del agar hierro triple azúcar y agar urea para identificar *Proteus*, una enterobacteria que es parte de la microbiota intestinal normal de muchos reptiles. Este es el primer informe de *S. Carrau* urea positivo. An-

teriormente, solo una cepa de *S. Cubana* con esta característica fue descrita en la literatura⁶. *S. e. diarizonae* se encuentra asociada principalmente a vertebrados de sangre fría. El serovar 48:i:z fue aislado de boa constrictora (*Boa constrictor constrictor*) y de ñacanina (*Hydrodinastes gigas*) en este estudio, fue informado en otros trabajos en aislamientos a partir de víbora cuerno de rinoceronte¹⁸ (*Bitis nasicornis*), de víbora de pestañas (*Bothriechis schlegelii*), de crótalo¹⁷ (*Crotalus willardi*), de crótalo tigre⁸ (*Crotalus tigris*) y de víbora rey californiana¹⁴ (*Lampropeltis gettulus californiae*) reflejando su presencia en diferentes especies de víboras de diferentes regiones del mundo. Los serovares 17:-:z, 65:-:z, 65:k:z y 38:z:-, son serovares denominados raros o exóticos y en la bibliografía consultada no fueron encontrados, confirmando la variedad y la presencia de nuevos serovares en reptiles. Todos los animales muestreados fueron víboras que no presentaron signos clínicos. Solo una pequeña proporción de *Salmonella* en reptiles causan signos clínicos o mortalidad¹² y esos serovares no fueron aislados en el presente trabajo, con la excepción del serovar IIIb 48:i:z, aislado en este estudio y de víboras con osteomielitis por Ramsay y col¹⁷. Todos los aislamientos incluidos en este trabajo fueron susceptibles a un amplio rango de antimicrobianos, lo que concuerda con los resultados de otros estudios^{7,18}. El origen de *Salmonella* spp. en reptiles no está claramente determinado. La infección puede residir en el ovario y puede ingresar por contaminación del

alimento o a partir de otros animales infectados^{3,19}. Las siete víboras ñacaninas (*Hydrodinastes gigas*) nacieron en el zoológico, por lo tanto, la vía de transmisión más probable pudo haber sido el ovario, ya que los animales fueron mantenidos encerrados en sus cajas sin tener contacto con otras especies animales. Las víboras incluidas en esta investigación siempre fueron alimentadas con animales de laboratorio, lo cual permite inferir que el alimento no fue la fuente de infección del microorganismo.

En este estudio se aislaron diferentes serovares aún en animales viviendo en la misma caja. Esto está en concordancia con lo hallado por Chiodini y Sundberg³, quienes informaron que *Salmonella* no parece que pueda diseminarse de un reptil a otro (vía horizontal), aún en ambientes cerrados. Los reptiles emergieron como una fuente significativa de infecciones por *Salmonella* en los últimos años y el peligro de transmisión a humanos puede incrementarse porque la infección por *Salmonella* es usualmente asintomática en los reptiles. Las personas que manipulan estos animales o limpian los accesorios de las víboras están expuestos a adquirir *Salmonella* spp. cuando no tienen en cuenta las medidas de protección adecuadas. Existen pocos trabajos acerca de *Salmonella* en víboras realizadas en zoológicos en Latinoamérica. Este es el primer informe sobre un estudio desarrollado en víboras de zoológico en la República Argentina.

Bibliografía

1. Andreaccio A, Miller F. *Salmonella* osteomyelitis transmitted from an iguana. Orthopedics. 2000; 23:1201-1202.
2. Bandy U, McCarthy H, Hannafin C. Reptile-Associated salmonellosis: a preventable pediatric infections. Med Health. R I. 2003; 86:27-29.
3. Chiodini RJ, Sundberg JP. Salmonellosis in reptiles: a review. Am J Epidemiol. 1981; 113:494-499.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement, 2009; M-100-S 19. Wayne, PA, USA.
5. Cohen ML, Potter M, Pollard R, Feldman RA. Turtle-associated salmonellosis in the United States, effect of public health action. 1970 to 1976. JAMA. 1980; 243:1247-1249.
6. Farmer JJ, McWohrter A, Huntley G, Catignani J. Unusual *Enterobacteriaceae*: a *Salmonella cubana* that is urease positive. J Clin Microbiol. 1975;1:106-107.
7. Geue L, Löschner U. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. Vet Microbiol. 2002; 84:79-91.
8. Grupka LM, Ramsay EC, Bemis DA. *Salmonella* surveillance in a collection of rattlesnakes (*Crotalus* spp.). J Zoo Wild Med. 2006; 37:306-312.
9. Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C. *Enterobacteriaceae*. In Koneman editor, Diagnóstico Microbiológico, 5th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. Springer, 1999; p 171-250.
10. Mermin JB, Hoar B, Angulo F. Iguanas and *Salmonella* Marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. Pediatrics 1997; 99: 399-402.
11. Nakadai A, Kuroki T, Kato, Y, Suzuki R, Yamai S, Yaginuma C et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in pet reptiles in Japan. J Vet Med Sci. 2005; 67:97-101.
12. Onderka DK, Fynlayson M C. *Salmonella* and salmonellosis in captive reptiles. Can J Comp Med. 1985; 49:268-270.
13. Pasmans P, De Herdt P, Chasseur-Libotte M, Ballasina, D, Haesebrouck F. Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy. Vet Rec. 2000; 146:256-258.

14. **Pedersen K, Lassen-Nielsen, A.M, Nordentoft S, Hammer A.S.** Serovars of *Salmonella* from captive reptiles. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56:238-242.
15. **Popoff M, Bockemuhl J, McWorther-Murlin A.** Supplement (n°34) to the Kauffman-White scheme. *Res Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1990; 142, 1029-1033.
16. **Popoff M.** Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars. 8th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France. 2001.
17. **Ramsay EC, Daniel GB, Tryon BW, Merryman JL, Morris PJ, Bemis DA.** Osteomyelitis associated with *Salmonella enterica* SS *arizonae* in a colony of ridgenose rattlesnakes (*Crotalus willardi*). *J Zoo Wild Med*. 2002; 33:301-310.
18. **Schröter M, Roggentin P, Hofmann J, Speicher A, Laups R, Mack D.** Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (serogroup IIIb): a prospective study. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70:613-615.
19. **Schröter M, Speicher A, Hofmann J, Roggentin P.** Analysis of the transmission of *Salmonella spp.* through generations of pet snakes. *Environ Microbiol*. 2006; 8:556-559.
20. **Shane S, Gilbert R, Harrington K.** *Salmonella* colonization in commercial pet turtles (*Pseudemys scripta elegans*) *Epidemiol Infect*. 1990; 105:307-316.
21. **Vigo G, Cappuccio J, Piñeyro P, Salve A, Machuca M, Quiroga M et al.** *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles-longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm. *Foodborne Path Dis*. 2009; 6:965-972.
22. **Waterman S, Juarez G, Carr S, Kilman I.** *Salmonella Arizonae* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *Am J Public Health*. 1990; 80, 286-289.
23. **Winfield M, Groisman E.** Role of nonhost environments in the lifestyles of *Samonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:3687-3694.
24. **Wray C, Sojka W.** Reviews of the progress of dairy science: Bovine salmonellosis. *J Dairy Res*. 1977; 44:383-425.