
Aislamiento de *Salmonella* y otras enterobacterias de carne fresca de víbora de cascabel *Crotalus* spp

A. Gatica-Colima^{1*} y J. López-Esparza²

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. ICB. Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

¹Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal. Programa de Biología.

²Laboratorio de Microbiología, Parasitología Ambiental y Diagnóstica. Academia de Microbiología.

Salmonella and other enterobacteria isolated from fresh meat of rattlesnake *Crotalus* spp

Abstract

Fresh rattlesnake meat is consumed as food by some people. It's known that *Salmonella* exists in some reptiles including rattlesnakes; however, the microbiological quality of fresh meat is unknown. Therefore the main objective of this study is to determine the presence of *Salmonella* associated with fresh rattlesnake meat, as well as recognized other enterobacteria species. Nine rattlesnakes were collected from the wild and samples were obtained from each individual for analysis. *Salmonella* colonies were isolated by NOM-114-SSA1-1994 methodology, then they were verified by the API-20E kit and VITEK-2 automated microbiology system. Eight samples (88.88%) resulted as *Salmonella*, 15 colonies were isolated by the first method. With API-20E kit and VITEK-2 the presence of *Salmonella* was confirmed in 11 strains from seven samples (77.33%). VITEK-2 was more specific determining *Salmonella enterica* ssp *arizonae* in seven strains from four samples of fresh rattlesnake meat. The results of this study can warn about the consumption of rattlesnake meat, thus, maybe decreased the anthropogenic impact over the rattlesnakes. In conclusion, *Salmonella* was isolated as well as other member of the Enterobacteriaceae from fresh rattlesnake meat samples. It's recommended not to eat fresh rattlesnake meat because it represents a risk for human health. Complementary methods were useful for the determination of enterobacteria, especially *Salmonella*.

Key words: rattlesnake, *Crotalus*, fresh meat, *Salmonella*, Chihuahua.

Resumen

La carne fresca de víbora de cascabel es consumida como alimento por algunas personas. Se ha reportado la existencia de bacterias del género *Salmonella* en algunos reptiles, incluyendo crotalinos, sin embargo, se desconoce la calidad microbiológica de ésta carne. Por ello se planteó como objetivo principal, determinar la presencia de *Salmonella* asociada a la carne fresca de víbora de cascabel así como la identificación de otras enterobacterias. Se recolectaron nueve serpientes de cascabel del género *Crotalus* del medio natural y se obtuvieron las muestras de cada individuo para su análisis. Siguiendo el procedimiento establecido por la NOM-114-SSA1-1994 se aislaron colonias de *Salmonella* y la verificación se hizo con el kit API-20E y el sistema automatizado de microbiología VITEK-2. El 88.88% (n=8) de las muestras de carne fresca resultaron sospechosas a *Salmonella*, de las que se aislaron 15 cepas con el primer método. Con API-20E y VITEK-2 se corroboró la presencia de *Salmonella* en 11 cepas correspondientes a siete muestras (77.33%). VITEK 2 fue más específico, determinando a *Salmonella enterica* ssp *arizonae* en siete cepas obtenidas de cuatro muestras de carne fresca. Los resultados de este trabajo pueden advertir sobre el consumo de serpientes de cascabel y así, quizás, disminuir el impacto antropogénico sobre las especies de crotalinos. En conclusión se aisló *Salmonella* así como otros miembros de la familia Enterobacteriaceae de muestras de carne fresca de víbora de cascabel. Se recomienda no comer la carne fresca de víbora de cascabel por el riesgo que representa a la salud humana. Los métodos complementarios fueron útiles en la determinación de enterobacterias,

*Autores de correspondencia
Email: agatica@uacj.mx

especialmente *Salmonella*.

Palabras clave: víbora de cascabel, *Crotalus*, carne fresca, *Salmonella*, Chihuahua.

Introducción

El aislamiento de *Salmonella* de la carne fresca comercializada en mercados y supermercados en México se ha evaluado por algunos autores. Robles-Reyes *et al.* (2001) aislaron *Salmonella* de pollos crudos que fueron adquiridos en diferentes mercados del estado de México utilizando dos métodos, el tradicional y la prueba de RavealTM. Zaidi *et al.* (2006) relacionaron la incidencia de *Salmonella* de carnes frescas de puerco, res y aves que se comercializan en Yucatán con personas con infecciones entéricas. Hasta donde se sabe el estudio microbiológico de las carnes no convencionales es poco conocido, aunque se ha documentado el consumo de carne de serpientes de cascabel como alimento para el humano por algunos autores (Schmitt, 1952; Goyan y Sucher, 1990; Fitzgerald *et al.*, 2004, Magnino *et al.*, 2009). *Salmonella* es comúnmente causante de infecciones inaparentes en el humano, lo cual puede ocultar resultados menos frecuentes como enfermedades serias, entre ellas enteritis y septicemia (Sadler *et al.*, 1969; Turnbull, 1979).

A pesar de que es conocida la presencia de *Salmonella* en reptiles (Caldwell y Ryerson, 1939; Hoff y White, 1977; Mitchell y Shane, 2001); ésta bacteria se ha aislado de muestras fecales y de cloaca de serpientes (Roggendorf y Muller, 1976; Murphy y Armstrong, 1978; Corrente *et al.*, 2004); asimismo, de la piel de la serpiente de cascabel *Crotalus atrox* (Sheridan *et al.*, 1989); pero no se ha reportado *Salmonella* en carne fresca de víbora de cascabel.

Los subproductos de las serpientes de cascabel, se han documentado como transmisores potenciales de *Salmonella*. Riley *et al.* (1988) postularon que la ingestión de cápsulas de víbora de cascabel por pacientes hispanos crónicos es una vía para la infección seria de *Salmonella arizona*. En otro estudio realizado en 22 pacientes latinos con infección de *Salmonella arizonae* se reportó que el 82% habían consumido con anterioridad cápsulas de víbora de cascabel antes de enfermarse (Waterman *et al.*, 1990). *Salmonella arizonae* y otras serovariedades se aislaron de cuatro

diferentes preparaciones de víboras de cascabel que fueron utilizadas como tratamiento para diferentes padecimientos (Babu *et al.*, 1990).

En México se han desarrollado muy pocos trabajos sobre aislamiento de *Salmonella* en serpientes. Rodríguez (1996) presenta los resultados de un análisis de detección de *Salmonella enterica* ssp *arizonae*, *Salmonella* spp., o ambas en un 45% de la población de serpientes en cautiverio del Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. La muestra incluyó 14 ejemplares de *Crotalus* de un total de 29 serpientes.

Es común la obtención ilegal de las serpientes de cascabel para la elaboración de productos y/o subproductos del medio silvestre, pero no se conoce el impacto sobre las poblaciones de las especies de *Crotalus* en México, donde todas las especies se encuentran en alguna categoría de riesgo (DOF, 2010).

Si bien se ha documentado la presencia de *Salmonella* en muestras como la piel y cloaca de ejemplares vivos y de subproductos como en las cápsulas elaboradas con carne seca molida de serpientes de cascabel, se esperaría encontrar *Salmonella* en la carne fresca de individuos silvestres, así como otras enterobacterias. La presente investigación tiene como objetivo aislar *Salmonella* de la carne fresca de víbora de cascabel del género *Crotalus* así como otras enterobacterias asociadas. Un estudio de esta naturaleza aporta nueva información sobre la calidad microbiológica de un recurso alimentario alterno en la zona desértica de Chihuahua.

Al reportar y divulgar los resultados de esta investigación sobre las enterobacterias asociadas, sobretodo *Salmonella* en la carne fresca de la serpiente de cascabel, se podrían prevenir y disminuir los riesgos a la salud humana e incluso quizás, reducir la demanda del recurso al bajar las extracciones de las serpientes del medio silvestre.

Materiales y métodos

Localización de los sitios de muestreo y trabajo de campo

De cuatro localidades de Chihuahua fueron obtenidos los individuos vivos de serpientes de cascabel del género *Crotalus*, de la localidad 1 en el rancho La Laguna, Municipio Nuevo Casas Grandes; de la localidad 2 en un camino de terracería en el Municipio de Ascensión; la localidad 3 fue en el rancho Aguachile y la 4 el rancho San Fernando, ambas en el Municipio de Camargo. Previa visita a las localidades garantizó la recolección de los ejemplares.

Durante la estación húmeda de verano de 2007 se realizaron tres salidas al campo, efectuando recorridos por las noches (21:00–23:30) con apoyo de lámparas de propano y por la mañana (8:30–11:30) buscando serpientes de cascabel en caminos de terracería. Una vez detectado un ejemplar se procedió a manejarlo con ganchos herpetológicos (Fur Mont Reptile Hooks) para introducirlo en un saco de manta, posteriormente fue pesado con una pesola Ohaus de 1, 000 x 10 g ó 2, 000 x 20 g (según el caso) y se colocó el saco con la serpiente dentro de una cubeta de 20 litros para su traslado al Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal de la UACJ.

Solo se colectaron nueve individuos debido al límite establecido en el permiso de colecta otorgado por la SEMARNAT.

Trabajo de Gabinete

Obtención de la carne fresca. En el laboratorio fueron manejados los ejemplares para tomar las medidas morfométricas convencionales (Pisani y Villa, 1974) de Longitud Hocico Cloaca (LHC) y de Longitud Total (LT). Con *sexing probes* se determinó el sexo (Schaefer, 1934). Se realizó la eutanasia de cada ejemplar de manera semejante como se realiza en campo, con un golpe en la cabeza, una vez muerto el ejemplar se le cortó la cabeza con un cuchillo filoso (Klauber, 1982), la cabeza fue colocada en un vaso de precipitado para evitar un accidente. Posteriormente se despellejó separando la piel. Cada ejemplar se disectó de manera ventral, los órganos, la grasa mesentérica y la canal fueron identificados. Cada componente fue pesado y almacenado. Una porción de la carne (canal) de cada muestra fue almacenada en bolsas plásticas al vacío con apoyo de FoodServer y fue congelada a -15 °C (5 °F) para su posterior análisis microbiológico, otra porción se utilizó para los análisis fisicoquímicos que no se reportan aquí. Todo el proceso fue

realizado bajo condiciones de esterilidad.

Análisis microbiológico de la carne. Para la determinación de *Salmonella* y otras enterobacterias se siguieron los pasos del método convencional establecido por la NOM-114-SSA1-1994 (DOF, 2002); una vez identificadas las cepas como *Salmonella* se realizaron subcultivos y confirmaron con dos métodos complementarios, el kit API 20E de BioMérieux® y por el sistema automatizado de microbiología VITEK-2.

Cada método utilizado en esta investigación se apoyó de diferente cantidad de pruebas bioquímicas: de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994 (DOF, 2002) con nueve; el sistema API 20E de BioMérieux® con 24 y el sistema VITEK-2 con 64 pruebas.

Primero se estandarizó la técnica establecida en la NOM-114-SSA1-1994 para aislamiento de *Salmonella* y otras enterobacterias de carne de víbora de cascabel, además se trabajo con los controles de *Salmonella* (aislado clínico) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) para probar la viabilidad de los medios de cultivo.

Una vez estandarizada la técnica se procedió de la siguiente manera, se pesaron y maceraron 25 gramos de carne fresca de víbora de cascabel, la muestra fue mantenida en un caldo lactosado (BIOXON) como medio de pre-enriquecimiento por 24 horas a una temperatura de 37 °C; posteriormente fue inoculada a caldos de enriquecimiento selectivo, para *Salmonella* se utilizó el caldo tetratonato (DIBICO) y para las enterobacterias el caldo verde bilis brillante (BIOXON) por 24 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se tomó una muestra para ser sembrada en cuatro medios para vaciado en placa, para *Salmonella* se utilizó el Sulfito de Bismuto (MERCK) y el de *Shigella-Salmonella* (BIOXON), para las enterobacterias se utilizaron el agar McConkey (MERCK) y el Verde Brillante (DIBICO) por 24 horas a 37 °C.

Las enterobacterias fueron identificadas con base a sus características morfológicas, realizándose las pruebas bioquímicas convencionales: TSI triple azúcar y hierro; LIA lisina hierro agar; citrato de Simmons; KIA Kigler hierro agar; PHE fenilalanina; URE urea; MIO movilidad indol ornitina (DIFCO); RM-VP rojo de metilo-Voges Proskauer y SIM movilidad indol sulfuros (BIOXON). La lectura de respuesta se realizó con

base al manual de Bergey's (Holt *et al.*, 1994). Las cepas correspondientes a *Salmonella* se serotipificaron con el kit Wellcolex Colour (REMEL) y se mantuvieron en un medio inclinado de soya tripticasa y glicerol, este medio permite la conservación de la cepa de *Salmonella* hasta por seis meses en refrigeración a 4 °C.

Con el segundo método de identificación, se aislaron las colonias a partir del medio soya tripticasa a un medio Haeckton (DIBICO) por 24 h de incubación, para posteriormente suspender en suero fisiológico salino e inocularlo en la tarjeta con 24 bioquímicas API-20E bioMerieux® (Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos gram negativos no exigentes). El resultado de las bioquímicas arrojó un código de ocho números que se cotejó con el Índice de Perfil Analítico 20E (Analytab, 1989).

Como tercer método de identificación se utilizó el equipo automatizado VITEK-2 compact (bioMerieux®), con el que se confirmaron las colonias Gram negativas. Para ello se colocaron en un contenedor los tubos con suero fisiológico y las muestras de enterobacterias a determinar. Las muestras deben tener una concentración entre 0.5 y 0.63 unidades McFarland la cual se midió con un colorímetro Vitek Densicheck (bioMerieux®), posteriormente se cargó una tarjeta para bacterias Gram negativas (GN) por muestra, cada tarjeta contenía 64 bioquímicas. Se colocó el contenedor en un compartimento de VITEK-2 y se etiquetaron las muestras con el software de VITEK-2 Systems. Se corrieron las muestras y se esperaron los resultados en un periodo de tiempo entre 3 y 12 horas.

Análisis de datos

Se calculó la prevalencia de las enterobacterias en las muestras de carne fresca de víbora de cascabel del género *Crotalus* como una expresión de la frecuencia.

La prevalencia corresponde al número de casos positivos entre el número total de muestras analizadas multiplicado por 100 (Pita-Fernández *et al.*, 2004).

Se generó una gráfica de las prevalencias de enterobacterias con base a los resultados del método convencional (NOM-SSA1-114-1994).

Se calculó la prevalencia de *Salmonella* por cada uno de los métodos.

Resultados y discusión

Se recolectaron nueve ejemplares (*Crotalus atrox*, n=7 y *C. scutulatus* n=2) de cuatro localidades correspondientes a tres municipios de Chihuahua: Nuevo Casas Grandes (Cs 1 y 2; Ca 1, 2, 6 y 7), Camargo (Ca 4 y 5) y Ascensión (Ca 3). El rango de la longitud total y peso de los ejemplares fue de LT=815-850 mm, w=450-500 g para los dos ejemplares de *C. scutulatus* y LT=567-1017 mm, w=325-1050 g para seis *C. atrox*.

La discusión se apoyó de trabajos hechos en muestras diferentes a la carne fresca de serpientes de cascabel, ya que no se encontró literatura para comparar los resultados. Todas las muestras de *Crotalus* presentaron enterobacterias con el método convencional (NOM-SSA1-114-1994), excepto una de *C. scutulatus* (Cs 1). Se ha documentado en algunos casos la ausencia de *Salmonella* en muestras (cloaca y heces) de reptiles hasta en un 49.5% de los reptiles muestreados (n=45) como lo reportaron Corrente *et al.* (2004); así como la ausencia total de *Salmonella* de la cloaca de 100 tortugas provenientes de ambientes naturales y artificiales (Readel *et al.*, 2008). La ausencia del crecimiento bacteriano en la muestra de carne se puede considerar atípica, se esperaría por lo menos un crecimiento de alguna enterobacteria en la muestra, sin embargo no ocurrió, pero cabe mencionar que de la muestra Ca 2 no se aislaron otras enterobacterias, sólo se aisló *Salmonella*, ambos ejemplares provienen de la misma localidad de Nuevo Casas Grandes.

Un total de 11 cepas se aislaron con el método convencional en ocho de las nueve muestras de carne fresca de víbora de cascabel, así como tres colonias no determinadas en tres muestras diferentes. Las enterobacterias aisladas son *Citrobacter* sp., *C. freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. También se reportó a *Pseudomonas* sp., un género que no forma parte de la Familia Enterobacteriaceae pero es considerada una enterobacteria ya que se encuentra en el intestino. La prevalencia de las enterobacterias con base al método convencional se presenta en la Figura 1.

Los resultados en las muestras de carne fresca analizadas en el presente estudio no coinciden con

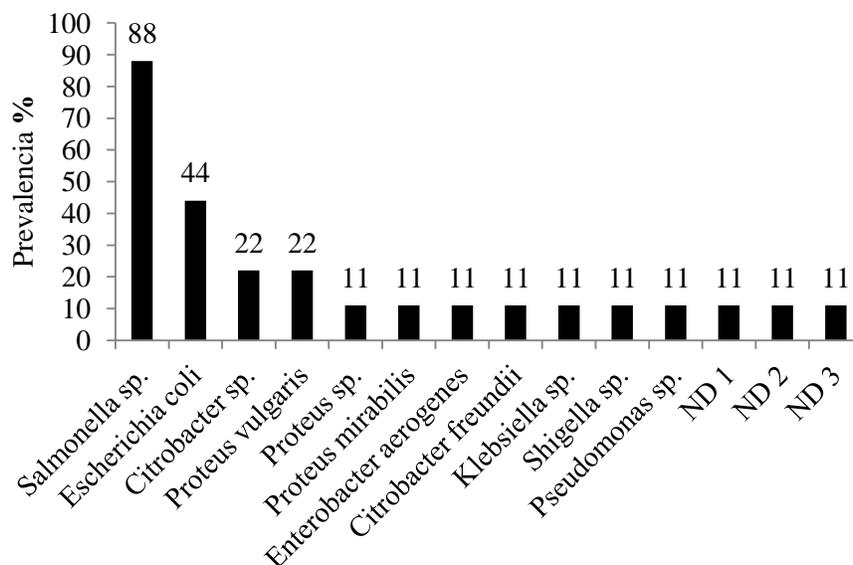


Figura 1. Prevalencia de enterobacterias incluyendo a *Salmonella* en carne fresca de serpiente de cascabel con base al método convencional.

los de Sheridan *et al.* (1989) quienes aislaron bacterias de la piel de serpientes vivas silvestres *Crotalus atrox*, pero si con los de Goldstein *et al.* (1979) quienes registraron a *Citrobacter sp.*, y *Proteus mirabilis* en veneno de *Crotalus viridis* y *Crotalus scutulatus*. Al igual con Ferreira *et al.* (2009) quienes compararon la microbiota de tres fuentes (la cavidad oral, cloaca y veneno) de diversos ejemplares silvestres de *C. durissus terrificus*, donde registraron a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Morganella morganii* como las más frecuentes, así como *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Proteus sp.*, y *Citrobacter freundii*. Sólo *P. vulgaris* se aisló de las tres fuentes, mientras *M. morganii* sólo de la cloaca. La contaminación bacteriana en el tracto digestivo de las serpientes podría deberse a las bacterias que presentan las presas consumidas por las serpientes, ya que se conoce que las presas pueden defecar al ser ingeridas por la serpiente como lo menciona (Goldstein *et al.*, 1979). De acuerdo con Holt *et al.* (1994) *Citrobacter* es considerada una oportunista, mientras *Enterobacter cloacae* es de amplia distribución en la naturaleza, *P. mirabilis* ocurre en el intestino de varios animales y *Morganella* se encuentra en reptiles y es un invasor oportunista secundario.

Las serpientes al estar en contacto con el suelo y las presas que consumen podrían infectarse con algunas bacterias.

En la Tabla 1 se presenta la relación de enterobacterias y *Salmonella* aislada de la carne fresca de víboras de cascabel con base a los tres métodos (NOM-114-SSA-1; API-20E y VITEK-2). Con el método convencional (NOM-114-SSA-1), el 88.88% ($n=8$) de las muestras de carne fresca de cascabel presentaron *Salmonella sp.*, entre una a tres cepas por muestra. Un total de 15 cepas se aislaron como *Salmonella sp.* Al verificarse con los métodos complementarios API-20E y VITEK-2 compact se determinaron 11 cepas (73.33%) como positivas a *Salmonella*, confirmándolo en siete muestras de carne fresca.

Se determinaron nueve cepas como *Salmonella spp.*, y en dos casos más, siendo específico para *Salmonella* subgrupo III *arizonae* por el método API-20E. Con el equipo VITEK 2 se determinaron 11 cepas, siendo más específicos los resultados: *Salmonella enterica arizonae* (7) y *Salmonella* grupo o Slashline (4).

La prevalencia de *Salmonella* con base a los resultados del método tradicional fue de 88%, con API-20E y VITEK-2 fue de 77% cada uno. Lo cual significa que el método convencional

Tabla 1. Relación de enterobacterias y *Salmonella* aisladas de carne fresca de *Crotalus* por el método NOM-114-SSA1-1994 y verificadas por API-20E y VITEK-2.

Muestras de ejemplar	NOM-SSA-114	API-20E	VITEK-2
Cs 2	<i>Escherichia coli</i> . <i>Klebsiella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella</i> Grupo
Ca 1	ND. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella</i> Grupo <i>Escherichia coli</i> <i>Morganella m. ssp morganii</i> <i>Shigella</i> Grupo
Ca 2	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella</i> Grupo <i>Escherichia coli</i>
Ca 3	ND <i>Salmonella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp. <i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>
Ca 4	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp. <i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella</i> Grupo <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>
Ca 5	<i>Citrobacter</i> sp. <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Morganella m. ssp. morganii</i>
Ca 6	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> ssp. <i>Salmonella</i> ssp.	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>
Ca 7	ND. <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Salmonella</i> subgrupo III <i>arizonae</i> <i>Salmonella</i> subgrupo III <i>arizonae</i>	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>

ND=No determinado

sobrestimó los resultados obtenidos con las muestras analizadas en el presente estudio, por ello, es importante complementar con otros métodos como lo recomiendan Edel y Kampelmacher (1969), quienes comprobaron que la tasa de recuperación de *Salmonella* de diferentes muestras en diferentes laboratorios no fue uniforme en los resultados, se requieren más estudios comparativos.

Se han aislado *Salmonella arizonae* y otros serovariedades de preparaciones secas de víbora de cascabel y cápsulas (Riley *et al.*, 1988; Babu *et al.*, 1990; Noskin y Clarke, 1990), la presencia de *Salmonella* en muestras secas podría deberse a

una contaminación debido al manejo de los ejemplares vivos y la higiene personal del colector como lo mencionan Aiken *et al.* (2010). Además podría ser durante el proceso de secado de la canal al extenderla en un cerco de púas por algunos meses como se ha observado que ocurre en las zonas áridas del norte de México (observación personal AGC).

Aunque se ha documentado que *Salmonella* se encuentra en el tracto gastrointestinal de las serpientes de cascabel (Martínez-Barreda *et al.*, 1999; Ferreiro *et al.*, 2009; Magnino *et al.*, 2009); la bacteria potencialmente podría migrar al tejido debido a que tiene las características de

invasividad y patogenicidad que están relacionadas con la producción de enterotoxinas y una citotoxina. Las enterotoxinas producidas pueden aumentar la permeabilidad vascular (Varnam y Evans, 1991), esto podría ser la razón de la contaminación de la carne fresca. Por otro lado, siendo la temperatura un factor que limita el desarrollo de *Salmonella* (7 °C y 47.8 °C) con un valor óptimo de 37 °C de acuerdo con Simonsen *et al.* (1987), se ha documentado que *Salmonella* se encuentra en organismos poikilotérmicos vertebrados (Farmer *et al.*, 1985; Holt *et al.*, 1994; Herrera-Arias y Santos-Buelga, 2005).

Los métodos complementarios permitieron determinar otras enterobacterias que fueron caracterizadas inicialmente como *Salmonella* con el método convencional. Del ejemplar Ca 5 se confirmó la presencia de *C. freundii* y se registró *Enterobacter cloacae* con API-20E; se ha documentado la presencia de *E. cloacae* en la carne seca de víbora de cascabel (Babu *et al.*, 1990). El método API-20E se ha utilizado por Mathewson (1979) en la determinación de 16 enterobacterias en siete especies de lagartijas del Oeste de Texas, siendo el 47.8% la mayor prevalencia para *Salmonella* sp., y *Enterobacter cloacae* con 41.8%. Cinco de las 16 enterobacterias coinciden con los resultados obtenidos para la carne fresca. Estas lagartijas habitan ambientes similares a los que utilizan los crotalinos en el desierto Chihuahuense, sin embargo no forman parte de la dieta de ellos, si es interesante destacar que este es el único trabajo comparativo en términos regionales. Por otro lado, *Morganella morganii ssp morganii* se detectó con el sistema VITEK-2, no se determinó *Salmonella* con los dos métodos complementarios.

Las cepas de *Salmonella*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* se pueden confundir en el medio donde crecen debido a la producción de sulfuro (Holt *et al.* 1994), esto quizás explica el error en su determinación inicial o con el método convencional, como se ha planteado en otros estudios con tortugas en condiciones naturales y artificiales (Readel *et al.*, 2008).

La presencia de *E. coli* con el método VITEK-2 pudo deberse a un proceso de contaminación al preparar la muestra, este método es muy preciso como se visualiza en la Tabla 2 sobre el desglose detallado que incluye tiempo de análisis, confiabilidad y tipo de identificación de los

resultados proporcionados por VITEK 2 (E=Excelente, MB=Muy Bueno y A=Aceptable), O'Hara y Miller (2003) comentan que este método es aceptable para la identificación de la mayoría de los organismos gran negativos.

El rango en el tiempo de análisis de las enterobacterias por el método VITEK 2 fue entre 3:50 y 10:25 horas. *Salmonella enterica ssp. arizonae* se determinó entre un tiempo de 3:50 y 5:00 horas con VITEK 2. La definición de Slashline en Enterobacteria requirió de repetir la muestra para confirmar el análisis, donde se determinó como Grupo *Salmonella* que se refiere a seis posibles serotipos de *Salmonella*: *S. ser. paratyphi B*; *S. ser paratyphi C*; *S. ser typhimurium*; *S. ser enteritidis*; *S. enterica ssp enterica* y *Salmonella* spp. El Grupo *Shigella* incluye a *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*. Siendo estas cepas patógenas al humano (Holt *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1996; Mermin *et al.*, 2004).

Un ejemplar de *C. scutulatus* dentro del análisis no presentó evidencias de microbiota, aún cuando se colectó del mismo hábitat que otros cinco ejemplares que resultaron positivos a *Salmonella*; se ha documentado que algunas serpientes pueden desarrollar resistencia, Chiodini (1982) reportó la distribución visceral de *Salmonella*, siendo el hígado y el tracto urinario los órganos más comunes de infección en las culebras *Sonora dekayi* y *Thamnophis sirtalis* en un estudio en el noreste de Estados Unidos. Sólo una resultó negativa a *Salmonella*, lo que fue un hallazgo inusual ya que todos los ejemplares se recolectaron de la misma área y estuvieron expuestos a las mismas oportunidades de infección, como en el presente estudio. También demostró el pasaje transovárico, donde las hembras de culebras resultaron positivas a *Salmonella* en aislamiento cloacales y sus fetos también, excepto en un caso donde una hembra resultó negativa, pero sus fetos positivos, de acuerdo con Chiodini y Sundberg (1981) esto es debido a la variabilidad en las tasas de excreción, que en este caso fueron negativas a *Salmonella*.

El análisis microbiológico de la carne de víbora de cascabel es de interés para el sector salud, ya que algunas infecciones de *Salmonella arizonae* en humanos se han asociado a la ingesta de la carne. Se conoce que de un paciente humano se llegó a aislar *Arizona hinshawii* de origen-ofídico, el cual

ha sido implicado como causante de osteomielitis (Croop *et al.*, 1984).

Ramsey *et al.* (2002) identificaron individuos de *Crotalus willardi* con *Salmonella arizonae* asociadas con osteomielitis, los autores comentan que es de interés conocer la salud de las serpientes de cascabel utilizando diagnósticos radiológicos para determinar la presencia de acúmulos de masa ósea en las vértebras. Esto es muy importante ya que las personas al sacrificar una serpiente de cascabel, la desollan y conservan la carne o canal que incluye las vertebras, lo cual puede ser un riesgo en caso de ingerir un animal enfermo.

La bacteria *Salmonella* está bien adaptada en reptiles que presentan infecciosas asintomáticas (Johnson-Delaney, 1996 citado en Corrente *et al.*, 2004) y pueden retener patogeneidad para animales de sangre caliente. Aunque se han reportado humanos como portadores sanos.

Existen pocos reportes disponibles de las granjas

donde se comercializan las serpientes para consumo humano, por ejemplo en Nepal las serpientes se mantienen para la producción de veneno, carne y piel que abastece la demanda internacional; en Estados Unidos las serpientes (cascabeles y pitones) se manejan para la producción de carne para consumo humano (Magnino *et al.*, 2009). Se desconoce el grado de calidad microbiológica de los productos ofertados en estos negocios.

No se encontró hasta la fecha un análisis microbiológico en carne fresca de víbora de cascabel, a pesar que se conoce el consumo de la carne desde el año de 1565 en Norteamérica (Schmitt, 1952). Con este trabajo se evidencia la presencia de *S. enterica arizonae* en carne fresca obtenida de víboras de cascabel silvestres. Por lo tanto, las serpientes son una fuente de contaminación y se recomienda no consumirla. En México, la norma de calidad para las carnes

Tabla 2. Resultados del análisis de muestras en VITEK 2 automatizado.

Muestras	Enterobacteria	C	T	Id	Observaciones
Ca 1	<i>Escherichia coli</i>	95	5,00	MB	
	Slashline*		6,00	MB	Grupo <i>Salmonella</i>
	<i>Shigella</i> group	87	10.25	A	Grupo <i>Shigella</i>
	<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	99	6,00	E	
Ca 2	<i>Escherichia coli</i>	95	5,00	MB	
	Slashline*		6,00	MB	Grupo <i>Salmonella</i>
Ca 3	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	3.50	E	
	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	3.75	E	
Ca 4	Slashline*		6,00	MB	Grupo <i>Salmonella</i>
	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	4.00	E	
Ca 5	<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	99	6,00	E	
Ca 6	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	94	5,00	MB	
	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	4.00	E	
Ca 7	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	4,00		
	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	99	4,00	E	
Cs 2	No definido		8,00		
	Slashline*	93	6,00	MB	Grupo <i>Salmonella</i>

Ca 1-7 muestras de carne fresca de *Crotalus atrox* y Cs 2=*C. scutulatus*.

C= Porcentaje de confiabilidad.

T=tiempo en horas.

Id=Calificativo de Identificación (MB Muy buena, A Aceptable y E Excelente).

* Slashline, comprende al Grupo *Salmonella* o *Shigella*.

convencionales maneja que la sólo presencia de una cepa o colonia en la muestra de alimento implica la destrucción del lote completo (NOM-114-SSA-1-1994).

Si se considera que para capturar una serpiente se tiene contacto con ella, ya es un riesgo que vale la pena considerar para evitar una zoonosis. Por otro lado, todas las serpientes de cascabel en México se encuentran en alguna categoría de riesgo NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF-2010), es importante conocer su biología en general y sus interacciones con el humano. El disminuir y evitar el consumo son medidas necesarias para evitar un riesgo de salud y una afección a las poblaciones silvestres. Los resultados de este trabajo pueden advertir sobre el consumo de serpientes de cascabel y por ello, se espera contribuir en la difusión de disminuir el impacto antropogénico sobre las especies de crotalinos.

Conclusiones

De las muestras de carne fresca de víbora de cascabel del género *Crotalus* se lograron aislar enterobacterias incluyendo a *Salmonella*.

Los métodos API-20E y VITEK 2 son complementarios para la determinación de enterobacterias incluyendo *Salmonella*. Son métodos rápidos y más confiables que las evaluaciones convencionales.

Se recomienda ampliar el número de muestra para estudios más completos de la caracterización microbiológica de carnes no convencionales.

Se debe realizar campañas de educación, debido a que el consumo de la carne es nocivo para la salud y por lo tanto de interés en salud pública.

Agradecimientos

La recolección de ejemplares se realizó bajo el permiso de colecta especial (Oficio número SGPA/DGVS/04660/06) proporcionado por la SEMARNAT, con apoyo en campo de Eduardo Macías, Fernando Chacón, Javier Guardado, Guillermo Martínez y Juan Cervantes. Gracias a Octavio Apodaca, Gwendolyne Peraza, Bertha Borrego, Julio del Hierro, Edna Ramos, Aracely Rivera, Jesús Ortíz y Álvaro Torres por su apoyo y sugerencias en el desarrollo de este trabajo. A PROMEP-UACJ por financiar el proyecto. A la Facultad de Zootecnia y Ecología de UACH y al

Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la UACJ por el apoyo brindado para realizar el proyecto, así como por las sugerencias proporcionadas al escrito. A los revisores del documento por parte de la revista.

Bibliografía

- Aiken, A. M., Lane, C. y Adak, G. K., 2010. Risk of *Salmonella* infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. Euro Surveill (en <http://www.eurosurveillance.org>).
- Almeida, C., Schuch, D., Gelli, D., Cuéllar, J., Diez, A. y Escamilla, J., 1996. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública: en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores. Pan American Health Organization, World Health Organization, Pan American Sanitary Bureau.
- Analytab, 1989. API-20E Analytical Profile Index, Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria. 9 ed. (actualización V9.1). Analytab Products. Plain View, N. Y.
- Babu, K., Sonnenberg, M., Kathpalia, S., Ortega, P., Swiatlo, A. y Kocka, F., 1990. Isolation of *Salmonella* from dried rattlesnake preparations. Journal of Clinical Microbiology, 28: 361-362.
- Caldwell, M. E. y Ryerson, D., 1939. Salmonellosis in certain reptiles. The Journal of Infectious Diseases, 65(3): 242-245.
- Chiodini, R. J., 1982. Transovarian passage, visceral distribution, and pathogenicity of *Salmonella* in snakes. Infection and Immunity, 36: 710-713.
- Chiodini, R. J. y Sundberg, J. P., 1981. Salmonellosis in reptiles: a review. American Journal of Epidemiology, 113: 494-499.
- Corrente, M., Madio, A., Friedrich, K. G., Greco, G., Desario, C., Tagliabue, S., D'Incau, M., Campolo, M. y Buonavoglia, C., 2004. Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. Journal of Applied Microbiology, 96: 709-715.
- Croop, J. M., Shapiro, B., Alpert, G., Campos, J. M. y Zavod, W., 1984. *Arizona hinshawii osteomyelitis* associated with a pet snake. Pediatric Infectious Disease Journal, 3: 188.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México, D. F.
- Edel, W. y Kampelmacher, E. H., 1969. *Salmonella* isolation in nine European laboratories using a standardized technique. Bulletin World Health Organization, 41(2): 297-306.
- Farmer, J. J. III., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'Hara, C. M., Morris, G. K., Smith, P. B. y Brenner, D. J., 1985. Biochemical

- identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 21: 46-76.
- Ferreira, R. Jr., Siqueira, A., Campagner, M., Salerno, T., Soares, T., Luchéis, S., Paes, A. y Barraviera, B., 2009. Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29: 999-1003.
- Fitzgerald, L., Painter, C. W., Reuter, A. y Hoover, C., 2004. Collection, Trade, and Regulation of Reptiles and Amphibians of the Chihuahuan Desert Ecoregion. TRAFFIC North America. World Wildlife Fund, Washington, D. C.
- Goldstein, E., Citron, D., González, H. y Russell, F., 1979. Bacteriology of rattlesnake venom and implications for therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 140: 818-821.
- Goyan, P. y Sucher, K., 1990. Diet counseling in a multicultural society. *The Diabetes Educator*, 16: 127-131.
- Herrera-Arias, F. C. y Santos-Buelga, J. A., 2005. Prevalencia de *Salmonella* spp en pescado fresco expedido en Pamplona (Norte de Santander). *Bistua*, 3(2): 34-42.
- Hoff, G. y White, F. H., 1977. *Salmonella* in reptiles: Isolation from free-ranging lizards (Reptilia, Lacertilia) in Florida. *Journal of Herpetology*, 11: 123-129.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. y Williams, S., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Co., Philadelphia.
- Klauber, L. M., 1982. Rattlesnakes. Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind. University of California Press. Berkeley, Los Angeles, CA.
- Magnino, S., Colin, P., Dei-Cas, E., Madsen, M., McLauchlin, J., Nöckler, K., Prieto-Maradona, M., Tsigarida, E., Vanopdenbosh, E. y Van Peteghem, C., 2009. Biological risks associated with consumption of reptile products. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 163-175.
- Martínez-Barreda, C., Gallegos-Antúnez, D. C., Bar, W., Márquez de Bar, G., Fernández-Cano, R. y Ruíz-Reyes, G., 1999. Reptiles "mascotas": una fuente potencial de infecciones por *Salmonella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 19: 266-269.
- Mathewson, J. J., 1979. Enterobacteriaceae Isolated from Iguanid Lizards of West-Central Texas. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(3): 402-405.
- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Koehler, J., Marcus, R. y Angulo F., 2004. Reptiles, Amphibians, and Human *Salmonella* Infection: A Population-Based, Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, 38 (Suppl 3): 253-261.
- Mitchell, M. A. y Shane, S. M., 2001. *Salmonella* in Reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10: 25-35.
- Murphy, J. B. y Armstrong, B. L., 1978. Maintenance of Rattlesnake in Captivity. University of Kansas Museum of Natural History. Special Publication No 3. Lawrence, Kansas.
- Noskin, G. y Clarke, J., 1990. *Salmonella arizonae* Bacteremia as the presenting manifestation of human immunodeficiency virus infection following rattlesnake meat ingestion. *Reviews of Infectious Diseases*, 12: 514-517.
- O'Hara, C. y Miller, J. M., 2003. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB Assay for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* and Other Nonenteric Gram-Negative Bacilli and Comparison with the Vitek GNI+ Card. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5): 2096-2101.
- Pisani, G. y Villa, J., 1974. Guía de técnicas de preservación de anfibios y reptiles. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Miscellaneous Publications. No. 2, Lawrence, Kansas.
- Pita-Fernández, S., Pértegas-Díaz, S. y Valdés-Cañedo, F., 2004. Medidas de frecuencia de enfermedad. *Fisterra* (en http://www.fisterra.com/mbe/investiga/medidas_frecuencia/med_frec2.pdf).
- Ramsey, E. C., Daniel, G. B., Tryon, B. W., Merryman, J. I., Morris, P. J. y Bemis, D. A., 2002. Osteomyelitis associated with *Salmonella enterica* ss *arizonae* in a colony of ridgenose rattlesnakes (*Crotalus willardi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33: 301-310.
- Readel, A., Phillips, C. A. y Goldberg, T., 2008. Absence of cloacal shedding of *Salmonella* in wild red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Herpetological Review*, 39(4): 427-430.
- Riley, K. B., Antoniskis, D., Maris, R. y Leedom, J. M., 1988. Rattlesnake capsules-associated *Salmonella arizonae* infections. *Archives Internal Medicine*, 148: 1207-1210.
- Robles-Reyes, R., Eusebio-Hernández, M. G. y Avilés-Ruiz, D., 2001. Evaluation of the Reveal™ Quick Test for *Salmonella* detection in raw chicken meat. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(2): 76-83.
- Rodríguez, M. O., 1996. Detección de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* como microbiota de serpientes en cautiverio mediante métodos microbiológicos convencionales e hibridización del ADN utilizando como sonda el gene ompC de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Roggendorf, M. y Muller, H. E., 1976. Enterobakterien bei Reptilien. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. I (Abt. Orig. A)*, 236: 22-35.
- Sadler, W. W., Brownell, J. R. y Fanelli, M. J., 1969. Influence of age and inoculum level on shed pattern of *Salmonella typhimurium* in chickens. *Avian Disesease*, 13: 793-803.
- Schaefer, W. H., 1934. Diagnosis of sex in snakes. *COPEIA*, 4: 181.
- Schmitt, M., 1952. "Meat's Meat": An account of the flesh-eating habits of western americans. *Western Folklore*, 11: 185-203.
- Sheridan, B. S., Wilson, G. R. y Weldon, P. J., 1989. Aerobic bacteria from the skin of the rattlesnake, *Crotalus atrox*. *Journal of Herpetology*, 23: 200-202.
- Simonsen, B., Bryan F. L., Christian, J. H. B., Roberts, T. A., Tompkin, R. B. y Silliker, J. H., 1987. Report from the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Prevention and control of food-borne Salmonellosis through application of hazard analysis critical point (HACCP). *International Journal of Food Microbiology*, 4: 227-247.
- Turnbull, P. B. C., 1979. Food poisoning with special reference to *Salmonella*: its epidemiology, pathogenesis and control. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 8: 663-714.
- Varnam, A. H. y Evans, M. G., 1991. Food borne Pathogens. An Illustrated Text. Wolf Publishing. Ltd. London.
- Waterman, S. H., Juárez, G., Carr, S. J. y Kilman, L., 1990. *Salmonella arizonae* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *American Journal of Public*

Health, 80: 286-289.
Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., León, V.,
Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., Zhao, S.,
Headrick M. y Tollefson, L., 2006. Nontyphoidal
Salmonella from Human Clinical Cases, Asymptomatic
Children, and Raw Retail Meats in Yucatan, México.
Clinical Infectious Diseases, 42: 21-28.