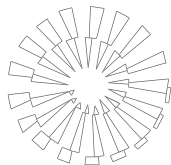


Excreción fecal de *Salmonella* Albany, su aislamiento en la ración alimenticia y repercusión en el estado de salud de un ocelote (*Leopardus pardalis*) en cautiverio



Fecal excretion of *Salmonella* Albany, its isolation in the diet and health repercussion on an ocelot (*Leopardus pardalis*) in captivity

Gabriela Silva-Hidalgo*† Héctor Samuel López-Moreno***
Vianney F. Ortiz-Navarrete*** Felipe Juárez-Barranco† Martín López-Valenzuela†

Abstract

Salmonella enterica serotypes are 99% responsible for salmonellosis in human and animals, especially *Salmonella enterica* serovar Albany that has been identified in chicken carcass representing a risk for human and animal health. *Salmonella enterica* serovar Albany was isolated from the feces of a male ocelot (*Leopardus pardalis*), at the zoo in Culiacán, Sinaloa, Mexico, and from raw chicken (feline's diet). The pulsed-field gel electrophoresis pattern (PFGE) generated by *Xba* I enzyme was identical in both isolates, indicating that the source of infection was the raw chicken. Five months after having isolated the bacteria from the feces, a *post mortem* study was carried out on the feline. Macroscopically, severe hemorrhagic enterocolitis and renal fibrosis was observed and microscopically, there was evidence of severe mononuclear lymphocytic infiltration in the ileum, as well as necrosis of intestinal villi and crypts, besides severe multifocal interstitial nephritis and fibrosis in both kidneys. The *invA* gene was amplified from intestinal samples confirming an infection by *Salmonella*. The microbiologic, molecular and histopathology diagnoses suggest that death of the feline was caused by ingestion of raw chicken contaminated with *Salmonella enterica* serovar Albany. This clinical case highlights the importance of persistent fecal *Salmonella* shedding animals and describes the molecular epidemiological relationships of isolates from feces and food, which allowed to find the primary source of infection.

Key words: SALMONELLOSIS, FECAL EXCRETION, RAW CHICKEN, OCELOT.

Resumen

Los serotipos de *Salmonella* especie *enterica* son los responsables del 99% de las salmonelosis en humanos y animales, en particular, *Salmonella enterica* serovariedad Albany se ha identificado en canales de pollo, por lo que representa un riesgo para la salud humana y animal. Se aisló *Salmonella enterica* serovariedad Albany a partir de heces de un ocelote macho (*Leopardus pardalis*), cautivo en el zoológico de Culiacán, Sinaloa, México, y de pollo crudo (alimento del felino). El patrón por electroforesis en campo pulsado (PFGE) con la enzima *Xba* I fue idéntico en ambos aislados, lo que indica que la fuente de infección fue el pollo crudo. Cinco meses después de haber aislado las bacterias de las heces, se realizó estudio *post mortem* del felino anteriormente mencionado, y se observó macroscópicamente: enterocolitis hemorrágica severa y fibrosis renal; y microscópicamente: necrosis de vellosidades y de criptas e infiltrado mononuclear linfocitario severo en íleon, además nefritis intersticial severa multifocal y fibrosis en riñón. A partir de muestras intestinales se amplificó el gen *invA* que confirma la infección por *Salmonella*. Los diagnósticos microbiológico, molecular e histopatológico sugieren que la muerte del felino se debió a la infección causada por la ingesta de pollo crudo contaminado con *Salmonella enterica* serovariedad Albany. Este caso clínico confirma la importancia que tienen los animales que excretan *Salmonella* vía fecal y describe la relación epidemiológica-molecular de los aislamientos obtenidos de heces y alimento, lo que permitió esclarecer la fuente primaria de infección.

Palabras clave: SALMONELLOSIS, EXCRECIÓN FECAL, POLLO CRUDO, OCELOTE.

Recibido el 26 de enero de 2011 y aceptado el 20 de septiembre de 2011.

*Programa Regional del Noroeste, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, 80040, Culiacán, Sinaloa, México. Tel./Fax: 01 (667) 713-66-15, correo electrónico gaby@uas.uasnet.mx.

**Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, 80040, Culiacán, Sinaloa, México, Tel./Fax: 01 (667) 713-66-15.

***Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, col. San Pedro Zacatenco, 07360, México, DF. Tel.: (01) (55) 50 61 38 00, ext. 5001, Fax: 50 61 39 38.

† Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Boulevard San Ángel s/n, Fracc. San Benito, 80246, Culiacán, Sinaloa, México, Tel./Fax: 01 (667) 718-16-50.

Nota: Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor.

Introduction

Salmonella genus belongs to the family Enterobacteriaceae. The genus is composed of Gram-negative bacilli that do not form spores,¹ and consists of only two species, *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica*, and six subspecies. Ninety-nine percent of salmonellosis in humans and animals is attributed to serovars of the *enterica* species,² of which approximately 2500 serotypes are known, classified by the sugars that constitute its bacterial wall, or by the proteins of its membrane or flagellars.³ Some *Salmonella* serovars are host-specific, such as in the case of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi), which only infects humans and causes typhoid fever. However, other serovars may infect many animal species, including man, for example *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) which only causes gastroenteritis, or *Salmonella enterica* serovar Albany (*Salmonella* Albany). The ability to cause disease in non specific hosts depends on bacterial adaptation to its environment;⁴ thanks to this, some serotypes survive in water and food, and when they are ingested by humans or animals, can cause gastrointestinal disorders of mild to serious evolution, or systemic infections as in the case of typhoid fever.⁵

Little is known about the role that wild animals in captivity play as reservoirs of *Salmonella*. Some authors have associated such genus with morbidity and mortality of zoo animals, the probable source of infection for these animals is fruit and food contaminated by rodents and small native birds that have access to shelters.⁶ Cubas⁷ found that *Salmonella* excretion in feces of birds and primates of South America zoos was common and that these animals did not present clinical signs. Oros *et al.*⁸ isolated *Salmonella arizonae* from digestive and respiratory lesions in snakes. Regarding wildlife felines, *Salmonella* has been isolated either from feces or food (raw meat); however, the serotypes found correspond to Typhimurium, Muenchen, Uganda, Newport, among others, with the exception of serovar Albany.⁹⁻¹¹ It is worth mentioning that felines, by their carnivorous condition, have a high risk of developing salmonellosis. Clyde *et al.* isolated *Salmonella* from feces of exotic felines that were fed raw meat; also, the excretion of the pathogen has been decreased by modifying the type of diet in these animals.^{10,11}

Salmonella Albany is a serovar rarely isolated from infectious processes; however, it has been identified in chicken carcass, for which it represents a potential risk for human and animal health.¹² *Salmonella*¹³ is the main source of food toxicoinfection in meat products, principally those from avian origin. *Salmonella* Albany was isolated from frozen chickens for exportation, destined for human consumption in Thailand¹⁴ and

Introducción

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos que no forman esporas,¹ y consta sólo de dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, y de seis subspecies. A los serotipos de la especie *enterica* se les atribuyen 99% de las salmonelosis en seres humanos y animales,² y se le reconocen aproximadamente 2500 serotipos, clasificados por los azúcares que constituyen su pared bacteriana, o bien por las proteínas de membrana o flagelares.³ Algunos de los serotipos de *Salmonella* son hospedero-específicos, como es el caso de *Salmonella enterica* serovariedad Typhi (*Salmonella* Typhi), que únicamente infecta al ser humano y ocasiona fiebre tifoidea. Sin embargo, algunos otros serotipos pueden infectar a muchas especies animales, incluyendo al hombre, por ejemplo *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) que únicamente ocasiona gastroenteritis, o *Salmonella enterica* serovariedad Albany (*Salmonella* Albany). La habilidad para causar enfermedad en hospederos no específicos depende de la adaptación bacteriana con su entorno ambiental,⁴ gracias a ello algunos serotipos sobreviven en agua, alimentos, y cuando son ingeridos por seres humanos o animales, pueden causar trastornos gastrointestinales de evolución de leve a grave, o infecciones sistémicas como es el caso de la fiebre tifoidea.⁵

Poco se sabe del papel que juegan los animales silvestres en cautiverio como reservorios de *Salmonella*. Algunos autores han asociado dicho género en la morbilidad y mortalidad de animales de zoológico, la probable fuente de infección para estos animales son las frutas y alimentos contaminados por roedores y pequeñas aves nativas que tienen acceso a los albergues.⁶ Cubas encontró que era común la excreción de *Salmonella* en heces de aves y primates de zoológicos de Sudamérica y que éstos no presentaban sintomatología clínica.⁷ Orós *et al.*⁸ aislaron *Salmonella arizonae* a partir de lesiones digestivas y respiratorias en serpientes. Por lo que respecta a felinos silvestres, se ha logrado aislar *Salmonella* tanto de heces como de alimento (carne cruda); sin embargo, las serovariedades encontradas corresponden a Typhimurium, Muenchen, Uganda, Newport, entre otras, a excepción de la serovariedad Albany.⁹⁻¹¹ Cabe mencionar que los felinos, por su condición carnívora, presentan un alto riesgo de desarrollar salmonellosis. Clyde *et al.* aislaron *Salmonella* de las heces de felinos exóticos alimentados con carne cruda, incluso se ha logrado disminuir la excreción del patógeno con la modificación del tipo de dieta en estos animales.^{10,11}

Salmonella Albany es una serovariedad raramente aislada de procesos infecciosos; sin embargo, se ha

in poultry slaughterhouses either in carcass or utensils and different working areas in abattoirs of Brazil,¹⁵ resulting to be the second most prevalent serovar isolated from poultry farms in Algeria.¹⁶ Birds and their byproducts used for human consumption constitute a significant source of *Salmonella* food outbreaks.¹⁷⁻¹⁹ Contamination of these products is an indicator of the lack of hygiene during food processing stage or in several meat distribution and refrigeration chains, which allows multiplication of *Salmonella*.²⁰

The present study demonstrates *Salmonella* Albany isolation from ocelot feces and raw chicken meat used as food, which suggests that the severe gastrointestinal disease of the feline was due to *Salmonella* Albany infection.

Case description

With the aim to identify *Salmonella* shedding animals during 2008, feces from a 10 year old male ocelot (*Leopardus pardalis*), captive in the zoo of Culiacan, Sinaloa, Mexico were collected. Two samples were taken, the first in January and the second in May. Likewise, samples of food given to the ocelot were also collected, raw chicken from a processing plant. In October of the same year, the preventive medicine program was applied, which subjects animals to stress due to imposed handling, coinciding with the following the two weeks clinical profile evolution of the ocelot: melena, anorexia, vomit, lethargy and dehydration. During this time the animal was medicated with sulphamonomethoxine-trimethoprim orally* and intramuscularly,** suspecting intestinal coccidiosis. That same October, the feline was submitted to the Laboratorio de Patología of the Universidad Autonoma de Sinaloa, for the necropsy study, 10 to 12 hours *post mortem*, established due to loss of *rigor mortis* in hind and front legs, with the exception of neck and head.

Diagnostic techniques used in raw chicken and fecal samples

Bacterial isolation. The culture mediums used for bacterial isolation were: tetrathionate broth* (48 hours incubation), semi-solid Rappaport Vassiliadis medium* ((24 hours incubation), XLT₄ agar** (24 hours incubation). In each one of the bacteriological techniques used during the development of this clinical case, *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 S) reference strain was used as control.

Biochemical confirmation and serotyping. The bacterial colonies isolated were subjected to biochemical confirmatory analysis. Biochemical tests used were: sorbitol broth, mucate broth, motility-indole-ornithine me-

identificado en canales de pollo, por lo que representa un riesgo potencial para la salud humana y animal.¹² La *Salmonella*¹³ es la primordial fuente de toxicoinfección alimentaria en productos cárnicos, principalmente los de origen aviar. En pollos congelados de exportación destinados para consumo humano en Tailandia¹⁴ y en rastros de aves tanto en canales como en utensilios y diferentes áreas de trabajo en rastros de Brasil,¹⁵ se aisló *Salmonella* Albany, y resultó ser la segunda serovariedad más prevalente aislada de granjas avícolas en Argelia.¹⁶ Las aves para consumo humano y sus productos constituyen una proporción significativa de las fuentes implicadas en brotes alimentarios de *Salmonella*.¹⁷⁻¹⁹ La contaminación de estos productos, es un indicador de la falta de higiene durante la etapa de procesamiento del alimento o bien en varias etapas de la cadena de distribución y refrigeración de la carne, lo que permite la multiplicación de *Salmonella*.²⁰

En el presente trabajo se demuestra el aislamiento de *Salmonella* Albany a partir de heces de un ocelote y de la carne de pollo cruda que se utilizaba como alimento, lo que sugiere que la enfermedad gastroentérica severa que padeció el felino se debió a la infección por *Salmonella* Albany.

Descripción del caso

Con la finalidad de identificar animales excretores de *Salmonella* durante 2008, se recolectaron heces del albergue de un ocelote macho (*Leopardus pardalis*) de 10 años de edad, cautivo en el zoológico de Culiacán, Sinaloa, México. Se tomaron dos muestras, la primera en enero y la segunda en mayo. Asimismo, también se recolectaron muestras del alimento ofrecido al ocelote, pollo crudo proveniente de una planta procesadora. En octubre del mismo año, se aplicó el programa de medicina preventiva, que somete a estrés a los animales por el manejo que se les impone, y que coincidió con la siguiente historia clínica de dos semanas de evolución en el ocelote: melena, anorexia, vómito, letargia y deshidratación. Durante ese tiempo se medicó al animal con sulfamonometoxina-trimetoprim vía oral* e intramuscular,** sospechando coccidiosis intestinal. Ese mismo mes de octubre se remitió al felino antes referido al Laboratorio de Patología de la Universidad Autónoma de Sinaloa para estudio de necropsia, después de 10 a 12 horas de muerto, lo que pudo constatarse por la pérdida de *rigor mortis* en miembros posteriores y anteriores, y rigidez cadavérica en cuello y cabeza.

*Daimetroprim, México.

**Daimeton B20/T, México.

dium (MIO), triple sugar-iron agar (TSI), lysine-iron agar (LIA), urease test and citrate test. Serotyping was carried out according to Kauffman-White scheme.²¹

Genus confirmation by polymerase chain reaction (PCR). Bacterial genus was confirmed by PCR with *invA* gene amplification.²²

Genotyping. Bacterial isolates genotyping was carried out by digestion of *Xba* I restriction enzyme and pulsed field gel electrophoresis (PFGE), using CHEF-DR III system*** at 6 V/cm during 18 h with pulses every 10-30 seconds. After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide and analyzed in a Gel-Doc™XR*** photodocumentation system.

Diagnostic techniques used in post mortem study

Necropsy study. Necropsy was carried out according to the technique described by Aline *et al.*²³ Intestine and kidney samples were taken for histopathological study. Samples were fixed in 10% buffered formaldehyde, at pH 7.2 for its process according to standard technique; cuts of tissue were made with a microtome at 2 to 4 µm in thickness and stained with hematoxylin and eosin technique (H&E).²⁴ The following degrees were considered to quantify lesions: slight degree when pathological changes in studied organs covered up to 25%; moderate degree, from 25 to 50%; and severe degree, from 50 to 100% of the affected organ.²⁵

Genus identification by PCR in paraffin-embedded tissues. For bacterial genus identification, a 14 µm cut of tissue from each paraffin block was made and placed in a 0.5 µl micro tube to carry out the PCR with the amplification of *invA* gene. DNA extraction procedure was carried out using 150 µl of Chelex® 100 Resin* solution at 5% and heating at 100°C for 30 minutes. Afterwards, it was centrifuged at 25,000 *g* for 10 min and the supernatant was transferred to a 0.5µl sterile micro tube.²⁶

In the feces and raw chicken analysis, bacterial isolation and gene *invA* amplification revealed the presence of *Salmonella* spp. Regarding the isolation, black coloured colonies (H₂S positive) were observed in XLT₄ agar, selective and differential culture for identifying *Salmonella*, confirming the genus by biochemical tests (sorbitol-positive, mucate-positive, MIO- (+, -,+), TSI-K/A, LIA-K/K, urease-negative and citrate-positive). In relation to *invA* gene amplification, the electrophoresis analysis showed an amplified product of 283 bp corresponding to the expected size for these primers. The strain serovar was determined classifying it as *Salmonella enterica* serovar Albany. Both strains showed the same electrophoresis pattern after diges-

Técnicas diagnósticas utilizadas en muestras de heces y pollo crudo

Aislamiento bacteriano. Los medios de cultivo utilizados para aislamiento bacteriano fueron: caldo tetratiónato* (incubación por 48 horas), medio semisólido Rappaport Vassiliadis* (incubación por 24 horas), Agar XLT₄** (incubación por 24 horas). En cada una de las técnicas bacteriológicas utilizadas durante el desarrollo de este caso clínico, se utilizó como testigo la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 S).

Confirmación bioquímica y serotipificación. Las colonias bacterianas aisladas se sometieron a un análisis bioquímico confirmatorio. Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron: caldo sorbitol, caldo mucato, medio motilidad-indol-ornitina (MIO), agar triple azúcar-hierro (TSI), agar lisina-hierro (LIA), prueba de ureasa y prueba de citrato. La serotipificación se realizó de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White.²¹

Confirmación del género mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). El género bacteriano se confirmó mediante PCR con la amplificación del gen *invA*.²²

Genotipificación. La genotipificación de los aislados bacterianos se realizó mediante la digestión de la enzima de restricción *Xba* I y electroforesis en campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), utilizando el sistema CHEF-DR III*** a 6 V/cm durante 18 h con pulsaciones cada 10-30 segundos. Después de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y fue analizado en un fotodocumentador GelDoc™XR.***

Técnicas diagnósticas utilizadas en el estudio post mortem

Estudio de necropsia. Se realizó la necropsia de acuerdo con la técnica descrita por Aline *et al.*²³ Se tomaron muestras de intestino y riñón para examen histopatológico. Las muestras se fijaron en formalina al 10%, amortiguada a pH de 7.2 para su procesamiento según la técnica estándar; se realizaron cortes de tejido en un micrótopo a un espesor de 2 a 4 µm y se tiñeron por la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).²⁴ Para cuantificar las lesiones se consideraron los siguientes grados: grado leve cuando los cambios patológicos en los órganos en estudio abarcaron hasta 25%, grado moderado, de 25 a 50%, y grado severo, de 50 al 100% del órgano afectado.²⁵

Identificación de género por PCR en tejidos incluidos en parafina. Para la identificación del género bacteriano se utilizó un corte de 14 µm del tejido de cada bloque

*Merck, Alemania.

**Difco, Estados Unidos de América.

***Bio-Rad, Estados Unidos de América.

tion with the *Xba* I restriction enzyme and with the PFGE technique (Figure 1).

Post mortem findings are described as follows.

Necropsy and histopathological study

Macroscopic findings. At external examination, the corpse showed poor muscular mass condition, severe dehydration and presence of stool at the crural region; at internal examination, presence of hemorrhagic exudate (severe hemorrhagic enterocolitis) was observed in ileum and colon (Figure 2) and diffuse fibroplasia in both kidneys (severe kidney fibrosis) (Figure 3).

Microscopic findings. The main findings were: in ileum, villi and crypt necrosis as well as severe mononuclear lymphocytic infiltrate (Figures 4 and 5), and in kidney, severe multifocal interstitial nephritis, fibrosis, congestion and hemorrhage (Figures 6 and 7).

PCR of paraffin-embedded tissues. DNA extraction from ileum amplified *invA* gene, showing in the electrophoresis analysis an amplified product of 283 bp, corresponding to the expected size for these primers. In the case of kidney, amplification was not possible.

The digestive symptomatology and macro and microscopic lesions, identified in experimental pathology researches, indicate a systemic infection caused by *Salmonella*.²⁷ In the present study, the diagnostic, microbiologic and molecular findings in feces, raw chicken and ileum, demonstrated that *Salmonella enterica* serovar Albany was the causal agent. It is possible that the feline could have recovered from a previous acute intestinal episode, with certain degree of systemic infection that allowed the bacterium to reach mesenteric lymph nodes, kidney and gallbladder, becoming a carrier, fact that is corroborated by positive isolations carried out before the ocelot's death.²⁶ Although there was no molecular evidence of *Salmonella* presence in kidney, the macro and microscopic kidney lesion is compatible with this pathogen agent, probably of chronic evolution,²⁷ because it is known that lipopolysaccharides (LPS) that form part of the bacterial external membrane and induce tubular cell death, cause lesions that are repaired through fibroplasia.²⁸ Likewise, it is worth mentioning that the specimen during the clinical profile, had risk factors associated with infection by *Salmonella*, such as age, season of the year and stress.²⁹ Animals subjected to stress, either to transportation, management or confinement, as in this case, have greater probability of shedding enteropathogens such as *Salmonella* in their manure,³⁰ and this fact increases risk of infection in other animals of the same or near shelters.³¹ In this case, it was not possible to isolate the enterobacterium *Salmonella* from

de parafina y se colocó en un microtubo de 0.5 µl para realizar la PCR con la amplificación del gen *invA*. El procedimiento de extracción de ADN, se llevó a cabo utilizando 150 µl de una solución de Chelex®100 Resin* al 5% y calentando a 100°C por 30 minutos. Luego se centrifugó a 25,000 g por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 0.5 µl estéril.²⁶

En el análisis de heces y pollo crudo, el tren de aislamiento bacteriano y amplificación del gen *invA* reveló la presencia de *Salmonella* spp. En lo referente al aislamiento se observaron en el agar XLT₄, medio de cultivo selectivo y diferencial para identificación de microorganismos del género *Salmonella*, colonias de tonalidad negra (H₂S positivas), confirmando el género por medio de las pruebas bioquímicas (sorbitol-positivo, mucato-positivo, MIO- (+, -, +), TSI- K/A, LIA-K/K, ureasa-negativa y citrato-positivo). Por lo que respecta a la amplificación del gen *invA*, el análisis electroforético mostró un producto amplificado de 283 pb correspondiente al tamaño esperado para estos iniciadores. Se determinó la serovariedad de la cepa clasificándola como *Salmonella enterica* serovariedad Albany. Ambas cepas presentaron el mismo patrón electroforético después de la digestión con la enzima de restricción *Xba* I y con la técnica de PFGE (Figura 1).

Los hallazgos en los estudios *post mortem* se detallan a continuación.

Estudio de necropsia e histopatológico

Hallazgos macroscópicos. A la inspección externa, el cadáver presentó una pobre condición de masa muscular, deshidratación severa y presencia de excremento en región crural; a la inspección interna, se observó en íleon y colon la presencia de un exudado hemorrágico (enterocolitis hemorrágica severa) (Figura 2) y fibroplasia difusa en ambos riñones (fibrosis renal severa) (Figura 3).

Hallazgos microscópicos. Los principales hallazgos fueron: en íleon, necrosis de vellosidades y de criptas así como un infiltrado mononuclear linfocitario severo (Figuras 4 y 5), y en riñón, nefritis intersticial severa multifocal, fibrosis, congestión y hemorragia (Figuras 6 y 7).

PCR de tejidos incluidos en parafina. El ADN extraído de íleon amplificó el gen *invA*, mostrando en el análisis electroforético un producto amplificado de 283 pb correspondiente al tamaño esperado para estos iniciadores. En el caso del riñón no se logró la amplificación.

La sintomatología digestiva y las lesiones intestinales macro y microscópicas, identificadas en diferentes investigaciones de patología experimental, indican una

*Bio-Rad, Estados Unidos de América.

the mesenteric lymph nodes of the ocelot; however, other researchers have been able to do it from lymphoid organs of marsupials in captivity.³² Regarding the mammalian order Carnivora, other studies have found this order as the most prevailing in *Salmonella*

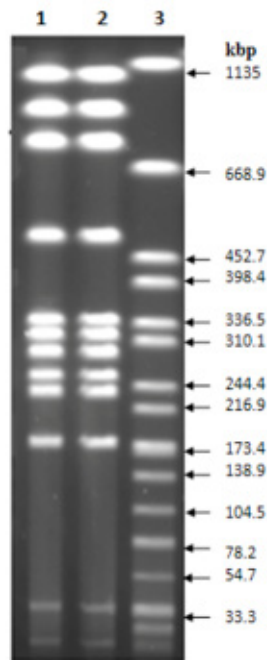


FIGURA 1. Patrones electroforéticos del ADN bacteriano digerido mediante la endonucleasa *Xba* I y sometido a PFGE. Carriles: 1) *Salmonella* Albany aislada de heces; 2) *Salmonella* Albany aislada de carne de pollo cruda; 3) *Salmonella* Braenderup H9812, marcador peso molecular (MPM) cepa de referencia.

FIGURE 1. Electrophoresis patterns of digested bacterial DNA by endonuclease *Xba* I and submitted to PFGE. Lanes: 1) *Salmonella* Albany isolated from feces; 2) *Salmonella* Albany isolated from raw chicken; 3) *Salmonella* Braenderup H9812, molecular weight marker (MWM) reference strain.

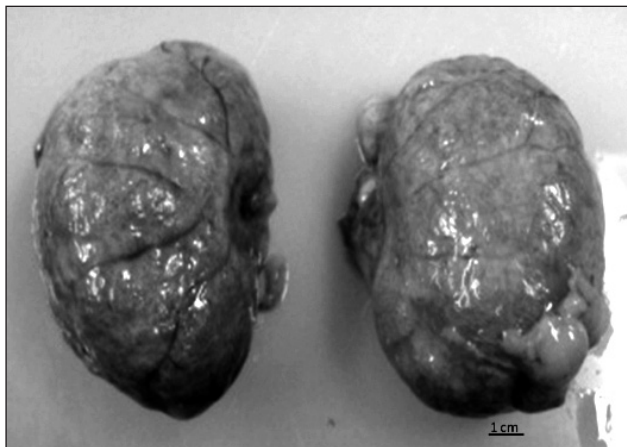


FIGURA 3. Cápsula renal de bordes irregulares: fibrosis renal.

FIGURE 3. Renal capsule with irregular borders: renal fibrosis.

infección sistémica por *Salmonella*.²⁷ En el presente estudio, los hallazgos diagnósticos, microbiológico y molecular en heces, pollo crudo e íleon, demostraron que se trató de *Salmonella enterica* serovariedad Albany. Es probable que el felino se haya recuperado de un episodio intestinal agudo anterior, con cierto grado de infección sistémica que permitió a la bacteria alcanzar linfonodos mesentéricos, riñón y vesícula biliar, convirtiéndose así en portador, hecho que se corrobora por los aislamientos positivos realizados antes de la muerte del ocelote.²⁶ Aunque no se tuvo evidencia molecular de presencia de *Salmonella* en riñón, la lesión renal macro y microscópica es compatible con dicho agente patógeno, probablemente de evolución crónica,²⁷ pues se



FIGURA 2. Mucosa intestinal con exudado hemorrágico severo: enterocolitis hemorrágica severa.

FIGURE 2. Intestinal mucosa with severe hemorrhagic exudate: severe hemorrhagic enterocolitis.

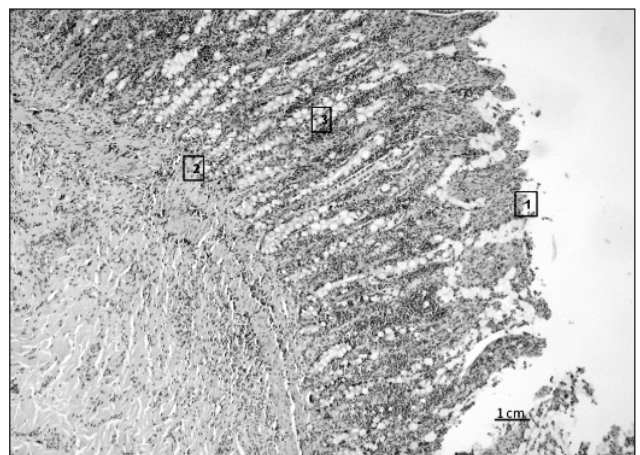


FIGURA 4. Sección histológica de íleon, donde se observa necrosis de vellosidades (1) y de criptas (2), así como un infiltrado mononuclear linfocitario severo (3) (H&E 10 X).

FIGURE 4. Ileum histological section, where villi (1) and crypts (2) necrosis are observed, as well as severe mononuclear lymphocytic infiltrate (3) (H & E 10 X).

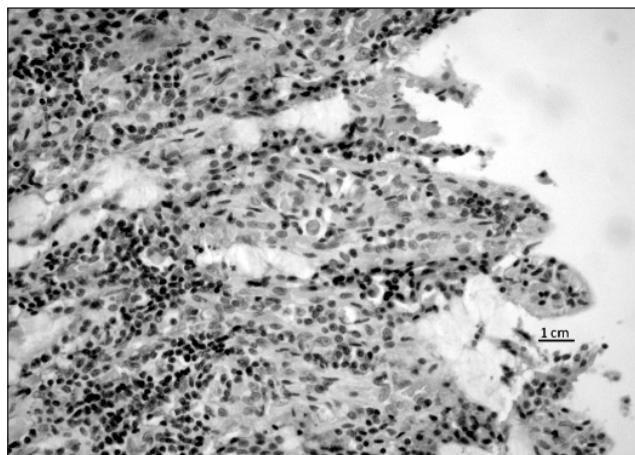


FIGURA 5. Acercamiento de la sección histológica de la Figura 4 (H&E 40 X).

FIGURE 5. Close up of Figure 4 histological section (H & E 10X).

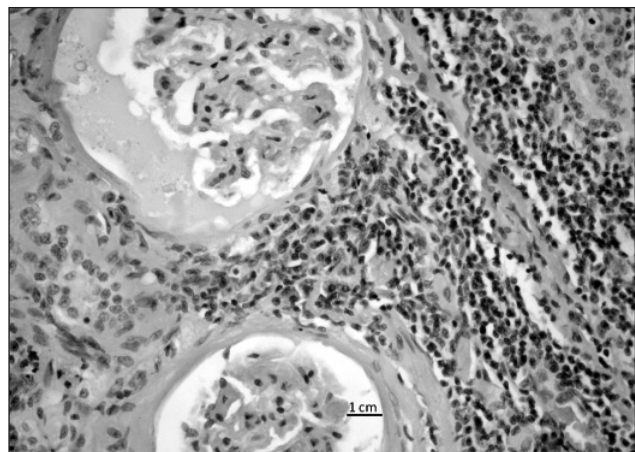


FIGURA 7. Acercamiento de la sección histológica de la Figura 6 (H&E 40 X).

FIGURE 7. Close up of Figure 6 histological section (H & E 40X).

shedding, also, within the same, the ocelot has been the species with the highest prevalence.⁶ Many researchers associate animal diet based on raw meat with *Salmonella* shedding in their manure, with an excretion prevalence that varies from 1 to 69%.³³ Onset and duration of fecal excretion are related to the infecting dose, type of exposure, serovar and host factors; additionally, *Salmonella* serovar present in stool could coincide with the one ingested at any moment in the week previous to excretion, or with the one present in recent ingested food.³⁴ Therefore, the type of diet has influence on positive isolates found in this case and is associated with bacterial contaminated raw meat.^{11,35} Although *Salmonella* is an enteropathogen involved mainly in food infections, other important exposure sources to this organism must be considered, such as:

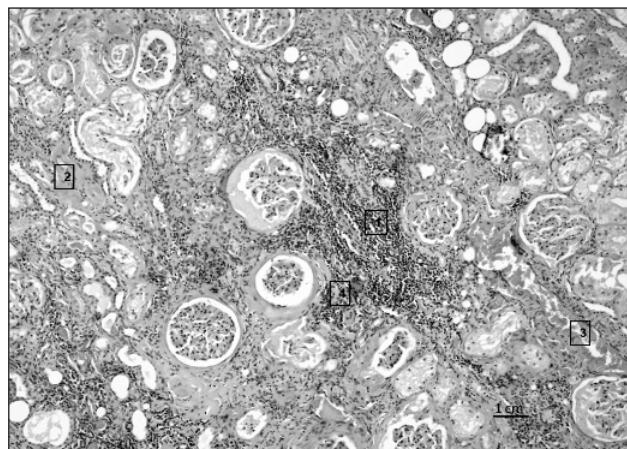


FIGURA 6. Sección histológica de riñón, donde se observa nefritis intersticial severa multifocal (1), fibrosis (2), congestión (3) y hemorragia (4) (H&E 10 X).

FIGURA 6. Kidney histological section, where severe multifocal interstitial nephritis is observed (1), fibrosis (2), congestion (3) and hemorrhage (4) (H & E 10X).

sabe que los lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de la membrana externa bacteriana que inducen a la muerte de células tubulares, producen lesiones que se reparan a través de fibroplasia.²⁸ De igual manera, cabe mencionar que el ejemplar durante el desarrollo del cuadro clínico, tuvo factores de riesgo asociados con la infección por *Salmonella*, como son la edad, época del año y el estrés.²⁹ Los animales sometidos a estrés, ya sea por transporte, manejo o bien por confinamiento, como en este caso, tienen mayor probabilidad de excretar enteropatógenos como *Salmonella* vía fecal,³⁰ y este hecho aumenta el riesgo de infección en otros animales del mismo albergue, o bien, de albergues contiguos.³¹ En este caso, no fue posible aislar la enterobacteria *Salmonella* de los linfonodos mesentéricos del ocelote; sin embargo, otros investigadores lo han logrado a partir de éstos órganos linfoides de marsupiales en cautiverio.³² Por lo que respecta al orden Carnívora, otras investigaciones han encontrado este orden como el de mayor prevalencia en excreción de *Salmonella* e incluso, dentro del mismo, el ocelote ha sido la especie que ha presentado la prevalencia más alta.⁶ Muchas investigaciones asocian la alimentación animal basada en carne cruda, con la excreción fecal de *Salmonella*, con prevalencias de excreción que varían entre 1 y 69%.³³ El inicio y la duración de excreción fecal están relacionados con la dosis infectante, tipo de exposición, serovariedad y factores del hospedero, además, la serovariedad de *Salmonella* presente en el excremento, podría coincidir con la serovariedad consumida en cualquier momento de la semana anterior a la excreción, o bien, con la que se encuentra en el alimento recién consumido.³⁴ El tipo de dieta influye por lo tanto, en los hallazgos de aislamientos

water, dust, direct contact with rodents or insects in the environment.^{36,39} It is also feasible that the bacteria can be disseminated through transport of contaminated soil on boots, clothing, or cleaning implements used by workers, hence the necessity to consider these factors to minimize the possibility of disseminating the bacterial agent, not only in the zoo, but in any environment.⁴⁰ Electrophoresis patterns observed in PFGE, either of the isolated strain from feces of ocelot or the one isolated from food were identical, which suggests that the source of infection is raw chicken. Recently, several researches have isolated a high percentage (50%) of *Salmonella* Albany from chickens,⁴¹ and it is one of the animal products more frequently associated with outbreaks of enteritis, septicemia and abortion in animals, and gastroenteritis and typhoid fever in humans.⁴² In this case, since it was possible to identify the primary source of infection, it is possible to implement strategic infection prevention measures in the rest of the carnivorous species, since non-typhic *Salmonella* shedding in this park can have clinical repercussions of great importance to public health, because it is a zoonotic pathogen,⁴⁴ as well as to other animal species in captivity sheltered in the zoo, which can behave as bacterial reservoirs and chronic carriers.⁴⁴

This clinical case highlights the importance of environmental contamination where there are animals shedding *Salmonella*, and even more, when these belong to collection exhibits in zoos, as is the case, which can have serious implications in public health, mostly in children less than five years of age, elderly, pregnant women and other immune-compromised individuals visiting these places.^{45,46} The relevance of salmonellosis epidemiology in healthy carrier wildlife animals has been reported by Hudson *et al.*⁴⁷ in the United States of America and by Refsum *et al.*⁴⁸ in Norway. *Salmonella* intestinal excretion by infected animals, including those that do not show clinical signs, represents a great challenge for establishing environmental health programs, because despite treating all infected animals with antibiotics, bacteria can be constantly shed and continue to contaminate the environment, other susceptible animals, or even water that constitutes a highly favorable medium for dissemination and multiplication of bacteria in general.⁴⁹ Being food one of the main infectious sources involved in gastrointestinal salmonellosis identified by several authors, the one given to carnivorous animals in captivity, should be similarly submitted to rigorous inspection as food for human consumption, which would decrease the risk of contamination and transmission of the disease.⁵⁰ Another prevention alternative, besides antibiotherapy and food safety inspections, is immune response stimulation through the addition of probiotic compounds in the diet, which favors rejection of potentially harmful

positivos encontrados en este caso y se asocia al consumo de carne cruda contaminada con la bacteria.^{11,35} Aunque *Salmonella* es un enteropatógeno involucrado principalmente en infecciones de tipo alimentario, hay que considerar también otras fuentes importantes de exposición a estos microorganismos, como el agua, el polvo, el contacto directo con roedores o insectos del entorno.³⁶⁻³⁹ Es factible también que la bacteria pueda diseminarse entre los albergues, a través de las botas, ropa, o implementos de limpieza utilizados por los trabajadores por lo que será necesario considerar estos factores, para lograr minimizar la posibilidad de dispersar el agente bacteriano, no sólo en el zoológico sino en cualquier ambiente.⁴⁰ Los patrones electroforéticos observados en la PFGE, tanto de la cepa aislada de las heces del ocelote como de la aislada del alimento fueron idénticos, lo que sugiere que la fuente de infección es el pollo crudo. Actualmente, diversas investigaciones han encontrado *Salmonella* Albany aislada de pollos en un alto porcentaje (50%)⁴¹ y es uno de los productos animales más asociado con cuadros de enteritis, septicemia y aborto en animales, y de gastroenteritis y fiebre tifoidea en el ser humano.⁴² En este caso, dado que se logró identificar la fuente primaria de infección, es posible implementar medidas estratégicas de prevención de la infección en las demás especies carnívoras, ya que la excreción de *Salmonella* no tífica en este centro recreativo puede tener repercusiones clínicas y de suma importancia en la salud pública, por tratarse de un agente patógeno de índole zoonótico,⁴³ así como en las otras especies animales en cautiverio albergadas en el zoológico, que pueden comportarse como reservorios de la bacteria y portador crónico.⁴⁴

Este caso clínico destaca la importancia de la contaminación del ambiente donde se alojan animales que excretan *Salmonella* en heces, y más aún, cuando estos ejemplares pertenecen a colecciones exhibidas en zoológicos, como en este caso, lo que puede tener serias implicaciones en la salud pública, sobre todo en niños menores de 5 años, ancianos, mujeres embarazadas y otros individuos inmunocomprometidos que acudan a estos centros recreativos.^{45,46} La relevancia de la epidemiología de la salmonelosis en los animales silvestres portadores sanos ha sido informada por Hudson *et al.*⁴⁷ en Estados Unidos de América y por Refsum *et al.*⁴⁸ en Noruega. La excreción intestinal de *Salmonella* por animales infectados, incluyendo aquellos que no muestran sintomatología clínica, representa un gran reto para establecer programas de sanidad ambiental, ya que a pesar de tratar con antibióticos a todos los animales infectados, las bacterias pueden ser excretadas constantemente en las heces y seguir contaminando el ambiente, a otros animales susceptibles, o bien, el agua que constituye un medio altamente favorable para la diseminación y multiplicación de las bacterias

infectious microorganisms, this can be done by production of specific immunoglobulins type A, modulating the development of dendritic cells, or by activation of NK cells.^{51,52} Regarding the infrastructure of the zoo, the restrictions that favor the risk of infection are: adequate facilities destined for hand washing, adequate number of visitors, designated areas for preparation and consumption of food for humans near zones for animal exhibits and bad management of waste water.⁵³ It will be necessary to conduct epidemiologic research following appropriate protocols for sampling of humans, animals and environment, including molecular subtyping of isolated pathogens, and that national and state public health laboratories report enteric infection outbreaks associated with animal contact.

It is concluded that it was possible to isolate *Salmonella* Albany from feces and food, as primary infection source, and it demonstrates the relevance of subtyping by PFGE. This work describes the epidemiologic-molecular relation of the isolates obtained from the zoo. The potential danger of non-typhic salmonellosis transmission between visitors or laborers of this zoo, should not be underestimated; therefore, it is urgent to implement disease surveillance systems in animals and persons, since it is unknown if diarrheic illnesses that show up in humans have genomic relation with serovars responsible of animal diseases. It will be necessary to continue with wider studies to be able to clarify the bacterial behavior of this serovar and prevent outbreaks in the human population of Sinaloa, Mexico.

Referencias

1. POPOFF MY, BOCKEMUHL J, GHEESLING LL. Supplement 2001 no. 45 to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2003; 154: 173-174.
2. COBURN B, GRASSL GA, FINLAY BB. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. Immunol Cell Biol 2007; 85:112-118.
3. POPOFF MY, BOCKEMUHL J, GHEESLING LL. Supplement 2002 no. 46 to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2004; 155:568-570.
4. KINGSLEY RA, BAUMLER AJ. Host adaptation and the emergence of infectious disease: The *Salmonella* paradigm. Mol Microbiol 2000; 36:1006-1014.
5. BALODA SB, CHRISTENSEN L, TRAJCEVSKA S. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. Appl Environ Microbiol 2001; 67:2859-2862.
6. NEERA V, GOPEE AA, KENNETH C. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. J Wild Dis 2000; 36: 284-293.
7. CUBAS ZS. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1996; 15 : 267-287.

en general.⁴⁹ Siendo el alimento una de las fuentes de infección primaria involucrada en salmonelosis gastroentérica identificada por varios autores, el ofrecido a los carnívoros cautivos, debería ser sujeto a la misma inspección rigurosa a que son sometidos los alimentos para consumo humano, lo cual reduciría el riesgo de contaminación y transmisión de la enfermedad.⁵⁰ Otra alternativa de prevención, además de la antibioterapia y la inspección sanitaria del alimento, es la estimulación de la respuesta inmune a través de la inclusión en la ración alimenticia de compuestos probióticos, los cuales favorecen el rechazo de microorganismos infecciosos potencialmente lesivos, esto lo pueden realizar mediante la producción de inmunoglobulinas específicas tipo A, modulando la maduración de células dendríticas, o bien, mediante la activación de células NK.^{51,52} En cuanto a la infraestructura propia del zoológico, las limitantes que favorecen el riesgo de infección son entre otras: instalaciones inadecuadas destinadas para el lavado de manos, flujo inadecuado de visitantes, zonas destinadas a la preparación y consumo de alimentos para consumo humano cercanas a las áreas de exhibición de animales y aguas residuales mal manejadas.⁵³ Será necesario conducir investigaciones epidemiológicas que sigan protocolos apropiados para el muestreo de seres humanos, animales y medio ambiente, incluyendo la subtipificación molecular de los patógenos aislados, además de que los laboratorios de salud pública estatales y nacionales informen sobre los brotes de infecciones entéricas asociadas con contacto animal.

De este trabajo se concluye que *Salmonella* Albany pudo ser aislada de heces y alimento, como fuente primaria de infección, y demuestra la importancia de la subtipificación por PFGE. Este comunicado describe la relación epidemiológica-molecular de los aislamientos obtenidos del parque zoológico. El peligro potencial de transmisión de salmonelosis no tífica entre los visitantes o bien entre los trabajadores de este centro recreativo no debe ser subestimado, por ello, es urgente implementar sistemas de vigilancia de enfermedades en animales y personas, ya que se desconoce si las afecciones de tipo diarreico que se presentan en los seres humanos tienen correspondencia genómica con las serovariedades responsables de los trastornos en animales. Será necesario continuar con estudios más amplios para estar en posibilidades de esclarecer el comportamiento bacteriano de esta serovariedad y prevenir brotes potenciales en la población humana de Sinaloa.

8. OROS J, RODRIGUEZ JL, HERRAEZ P, SANTANA P, FERNANDEZ A. Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella* arizonae in two snakes. J Com Pathol 1996; 115: 185-189.

9. VENTER EH, VAN VUUREN M, CARSTENS J, VAN DER WALT ML, NIEUWOUDT B, STEYN H *et al.* A molecular epidemiologic investigation of *Salmonella* from a meat source to the feces of captive cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildl Med* 2003; 34: 76-81.
10. LEWIS CE, BEMIS DA, RAMSAY EC. Positive effects of diet change on shedding of *Salmonella* spp in the feces of captive felids. *J Zoo Wildl Med* 2002; 33: 83-84.
11. CLYDE VL, RAMSAY EC, BEMIS DA. Fecal shedding of *Salmonella* in exotic felids. *J Zoo Wildl Med* 1997; 28:148-152.
12. MOLLA B, MESFIN A. A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets in central Ethiopia. *Rev Med Vet* 2003; 154: 267-270.
13. ANTUNES P, RÉU C, SOUSA JC, PEIXE L, PESTANA N. Incidence of *Salmonella* poultry and their susceptibility to microbial agents. *Int J Food Microbiol* 2003; 82: 97-103.
14. VADHANASIN S, BANGTRAKULNONT A, CHIDKRAU T. Critical control points for monitoring *Salmonellae* reduction in Thai commercial frozen broiler processing. *J Food Prot* 2004; 67: 1480-1483.
15. FUZIHARA TO, FERNANDES SA, FRANCO BD. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *J Food Prot* 2000; 63: 1749-1753.
16. ELGROUD R , ZERDOUMI F, BENAZZOUM M, BOUZITOUNA-BENTCHOUALA C, GRANIER SA, FRÉMY S *et al.* Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria). *Zoon Pub Health* 2009; 56: 84-93.
17. PATRICK ME, ADCOCK PM, GOMEZ TM, ALTEKRUSE SF, HOLLAND BH, TAUXE RV *et al.* *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerg Infect Dis* 2004;10: 1-7.
18. TAUXE RV. *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J Food Prot* 2001; 54: 563-568.
19. UYTENDAELE MR, DEBEVERE JM, LIPS RM, NEYTS KD. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *Int J Food Microbiol* 1998; 40:1-8.
20. VAN TTH, MOUTAFIS G, ISTIVAN T, THUOC TL, COLOE PJ. Detection of *Salmonella* spp in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6885-6890.
21. KAUFFMANN FRITZ. Serological diagnosis of *Salmonella*-species, Kauffmann-White-schema. Baltimore: Williams and Wilkins, 1972.
22. RAHN, K, CLARCK R, GINOCCHIO C, GALAN JE, CURTISS R, GILES C. Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by PCR as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molec Cell Probes* 1992; 6: 271-279.
23. ALINE A, CONSTANTINO F. La Necropsia. Técnicas de Necropsias en Animales Domésticos. 2da ed. Editorial El Manual Moderno 2002: 13-49.
24. PROPHET E, MILLS B, ARRINGTON J, SOBÓN L. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington DC: Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
25. RUIZ FG, CONSTANTINO CF, QUINTANA LJA. Patogenia de *Salmonella* Enteritidis FT 13a y *Salmonella* Enteritidis biovar Issatschenko en pollos de engorda. *Vet Méx* 2008; 39: 2.
26. HUSTON CL, WITTUM T, LOVE BC, KEEN J. Persistent fecal *Salmonella* shedding in five dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 650-655.
27. WRAY C, SOJKA J. *Salmonella* Dublin infection of calves: use of small doses to simulate natural infection on the farm. *J Hyg* 1981; 87: 501-509.
28. LOMBORGSR, AGERHOLMJS, JENSEN L, NIELSEN LR. Effects of experimental immunosuppression in cattle with persistently high antibody levels to *Salmonella* Dublin lipopolysaccharide O-antigens. *Vet Res* 2007; 3:17-22.
29. LAUPLAND KB, SCHØNHEYDER HC, KENNEDY KJ, LYYTIKÄINEN O, VALIQUETTE L, GALBRAITH J *et al.* *Salmonella enterica* bacteraemia: a multi-national population-based cohort study. *Infect Dis* 2010; 10: 95.
30. MARG H, SCHOLZ HC, ARNOLD T, ROSLER U, HENSEL A. Influence of long-time transportation stress on re-activation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2001; 114:385-388.
31. WEBB CR. Investigating the potential spread of infectious diseases of sheep via agricultural shows in Great Britain. *Epidemiol Infect* 2006; 134:31-40.
32. THOMAS JC, FORBES-FAULKNER R, SPEARE R, MURRAY C. Salmonellosis in wildlife from Queensland A. D. *J Wildl Dis* 2001; 37: 229-238.
33. LEJEUNE JT, HANCOCK DD. Public health concerns associated with feeding raw meat diets to dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1222-1225.
34. FINLEY R, RIBBLE C, ARAMINI J, VANDERMEER M, POPA M, LITMAN M *et al.* The risk of *Salmonella* shedding by dogs fed *Salmonella*-contaminated commercial raw food diets. *Can Vet J* 2007; 48:69-75.
35. LENZ J, JOFFE D, KAUFFMAN M, ZHANG Y, LEJEUNE J. Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the feeding of raw meat to dogs. *Can Vet J* 2009; 50:637-643.
36. HOLT PS, GEDEN CJ, MOORE RW, GAST RK. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-Challenged Hens. *Applied Environ Microb* 2007; 73: 6030-6035.
37. KOPANIC RJB, SHELDON W, WRIGHT CG. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: laboratory and field trials. *J Food Prot* 1994; 57: 125-132.
38. YOKOYAMA E, MARUYAMA S, KABEYA H, HARA S, SATA S, KUROKI T *et al.* Prevalence and genetic properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium definitive phage type 104 isolated from *Rattus norvegicus*

- and *Rattus rattus* house rats in Yokohama city, Japan. Appl Environ Microb 2007; 73: 2624-2630.
39. ABDEL-MONEM MHAA, DOWIDAR A. Recoveries of *Salmonella* from soil in eastern region of Saudi Arabia Kingdom. J Egypt Public Health Assoc 1990; 65: 61-75.
 40. MARIN C, HERNANDIZ A, LAINEZ M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. Poult Sci 2009; 88 :424-431.
 41. MUSSARET BZ, MCDERMOTT PF, FEDORKA-CRAY P, LEON V, CANCHE C, HUBERT SK et al. Nontyphoidal *Salmonella* in people and meat in Yucatan. Clin Infec Dis 2006; 42: 21-28.
 42. GUTIERREZ CA, PAASCH ML, CALDERON AN. Salmonellosis and campylobacteriosis, the most prevalent zoonosis in the world. Vet Méx 2008; 39: 81-90.
 43. HERRERA-LEON S, SACO M, MARTINEZ SILVESTRE A, SILVEIRA L, ECHEITA A, USERA MA. Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13,22:z39:- isolated from a lizard. Res Microbiol 2005; 156: 597-602.
 44. SALYERS AA, WHITT DD. *Salmonella* infections. In: SALYERS AA, WHITT DD, editors. Bacterial Pathogenesis – a molecular approach. 2nd ed. New York, USA: ASM Press, 2002: 229-243.
 45. PEJCIC-KARAPETROVIC B, GURNANI K, RUSSELL MS, FINLAY BB, SAD S, KRISHNAN L. Pregnancy impairs the innate immune resistance to *Salmonella* Typhimurium leading to rapid fatal infection. J Immunol 2007; 179:6088-6096.
 46. ADETUNJI A, OLUTAYO O, VEL S. Fatal dual infection with *Salmonella* and *Mycobacterium avium* complex infection in a patient with advanced acquired immunodeficiency syndrome: a case report. Cases J 2009; 2: 6773.
 47. HUDSON CR, QUIST C, LEE MD, KEYES K, DODSON SV, MORALES C *et al.* Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. J Clin Microbiol 2000; 38: 1860-1865.
 48. REFSUM T, HANDELAND K, BAGGESEN DL, HOLSTAD G, KAPPERUD G. *Salmonella* in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 5595-5599.
 49. DAHL J, WINGSTRAND A, NIELSEN B, BAGGESEN DL. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by the strategic movement of pigs. Vet Rec 1997; 140:679-681.
 50. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Manufacture and labeling of raw meat foods for companion and captive noncompanion carnivores and omnivores. US FDA, 2004.
 51. BOCK-GIE J, JAE-HYUNG KO, BONG-JOO L. Dietary supplementation with a probiotic fermented four-herb combination enhances immune activity in broiler chicks and increases survivability against *Salmonella* Gallinarum in experimentally infected broiler chicks. J Vet Med Sci 2010; 72: 1565-1573.
 52. RIZZELLO V, BONACCORSI I, DONGARRA ML, NIELSEN FL, FERLAZZO G. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. J Biomed Biotech 2011; doi:10.1155/2011/473097.
 53. BENDER JB, SHULMAN SA. Reports of zoonotic disease outbreaks associated with animal exhibits and availability of recommendations for preventing zoonotic disease transmission from animals to people in such settings. J Am Vet Med Assoc 2004; 224:1105-1109.