



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsa

Förekomsten av Salmonella hos reptiler i
Svenska hushåll
samt en jämförelse mellan två selektiva
odlingsmedia

Veronica Orell Vikström

Uppsala

2012

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:58

SLU
Sveriges lantbruksuniversitet

Förekomsten av *Salmonella* hos
reptiler i Svenska hushåll
samt en jämförelse mellan två
selektiva odlingsmedia

Veronica Orell Vikström

*Handledare: Sofia Boqvist, Institutionen för Biomedicin och Veterinär
Folkhälsa*

Biträdande handledare: Lise-Lotte Fernström

*Examinator: Gunilla Trowald-Wigh, Institutionen för Biomedicin Veterinär
Folkhälsa*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsa
Kurskod: EX0234, Nivå AXX, 30hp*

Nyckelord: Salmonella, reptiler, odling, XLD+N, MSRV, RVS

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:58*

SAMMANFATTNING

Salmonellos är en av de viktigaste gastrointestinala infektionerna i världen. Den ger i vanliga fall en okomplicerad gastroenterit hos människor men kan i sällsynta fall spridas i kroppen och leda till allvarlig sjukdom och dödsfall. Bakterien är zoonotisk och då det idag anses att alla reptiler bär på salmonellabakterier är det ur folkhälsosynpunkt viktigt att få en uppskattning om hur vanlig salmonella är på sällskaps/hobby reptiler och terrarier i svenska hushåll. Syftet med studien var att uppskatta förekomsten av salmonella hos svenska reptiler och deras miljö samt ta reda på vilka underarter och serovarer som förekommer.

Djurägarna kontaktades via olika internetforum för reptilägare och skickade in kloksvabbprov med tops från max en reptil per terrarie samt bottenmaterial från upp till 10 terrarier. *Salmonella* spp. isolerades sedan med metodiken beskriven av NMKL. Alla prover sattes på både RVS buljong och MSR/V medium för att kunna jämföra dessa.

I studien deltog 14 hushåll med 63 individprover och 62 miljöprover från 20 olika arter av reptiler. Studien visade att 80 % av de undersökta terrarierna var positiva för salmonella på miljö- och/eller individprovet och 45 % av dem hade mer än en underart eller serovar. Av individproverna var 61 % positiva för Salmonella. De två vanligaste underarterna var *S. enterica* och *S. diarizonae*.

Resultaten visar även på en signifikant ($p=0,02$) högre förekomst hos ormar jämfört med ödlor men kan inte påvisa någon signifikant skillnad baserat på ålder, import, foder eller kön. I denna studie hade MSR/V högre känslighet (54 % positiva) än RVS (43 % positiva) för de underarter och serovarer som är vanliga hos de svenska sällskaps/hobby reptilerna.

Då *Salmonella* spp. utsöndras intermittent är den funna förekomsten sannolikt lägre än den faktiska förekomsten och antagandet att alla reptiler bär Salmonella bör därför kvarstå. För att öka känsligheten i framtida studier bör både kloksvabb och miljöprov tas och proverna bör hellre sättas på MSR/V än på RVS.

SUMMARY

Salmonella is one of the most important zoonotic pathogens in the world. Usually infection leads to non-severe gastroenteritis in humans but can in rare cases spread to other organs causing serious disease or even death. As reptiles are considered common carriers of Salmonella it is from a public health view important to estimate how common salmonella is in Swedish pet/hobby reptiles and terrarium. The purpose of this study was to determine the prevalence of Salmonella in Swedish reptiles and their environment and to investigate which subspecies and serovars were prevalent.

The reptile owners were contacted via several internetforums for reptile owners. Those who volunteered to participate in the study sent both a cloacaesample taken with a cotton swab from maximum one reptile per terraria and a sample of substrate from a maximum of 10 terrariums. *Salmonella* spp. was isolated with methods described by NMKL. All samples were inoculated in both RVS broth and MSRV medium for comparison.

A total of 14 household participated in the study and 63 individual and 62 environmental samples from 20 different reptile species were collected. It was found that 80 % of the participating terraria were positive for Salmonella in the individual sample and/or the environment sample and 45 % of them had more than one subspecies or serovar. *Salmonella* spp. were found in 61 % of the individual samples. The most common subspecies were *S. enterica* and *S. diarizonae*.

The results showed a significant ($p=0,02$) higher prevalence in snakes compared to lizards but no significant difference based on age, importation, feed or sex. It was also shown that MSRV had a higher sensitivity (54 % positive) compared to RVS (43 % positive) to the subspecies and serovars found in this study. Since Salmonella is being shed intermittently the prevalence found is likely lower than the true prevalence and the assumption that all reptiles carry Salmonella should stand. To increase the sensitivity in future studies both cloacae and environmental samples should be taken and inoculation in MSRV is preferred before RVS.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	5
Salmonella	5
Salmonellos hos människor	5
Salmonellos.....	5
Patofysiologi	6
Symptom.....	6
Reptil associerad salmonellos	7
RAS i Sverige	7
Salmonella hos reptiler	8
Salmonellos hos däggdjur	9
SYFTE	11
MATERIAL OCH METODER	12
Kontakt och information	12
Provtagning	12
Preberikning.....	13
Anrikning	13
Isolering	15
Identifiering	16
Serotypning	18
Lagring.....	18
Statistik	19
RESULTAT	20
Salmonella isolerade från deltagande hushåll och terrarier	20
Salmonella isolerad från miljöprover	23
Salmonella isolerad från individprover.....	23
Jämförelse mellan individprover och miljöprover.....	25
Jämförelse mellan MSRV och RVS	25
Demografiska data	26
DISKUSSION.....	28
KÄLLFÖRTECKNING.....	30
Artiklar.....	30
Internet	32
Böcker.....	32

Intervjuer.....	32
Bilaga 1 - Djurägarbrev	33
Bilaga 2 – Remiss	35

INLEDNING

Salmonella

Genus *Salmonella* hör till familjen Enterobacteriaceae. och isolerades för första gången 1888 från nötkött i samband med ett utbrott av matförgiftning i Tyskland (Thorns, 2000; Minor et al, 1987). Det är en zoonotisk, gramnegativ, stavformad bakterie som är oxidasnegativ, katalaspositiv, oftast fakultativt anaerob, vanligen flagellerad och motil (Minor et al, 1987; Aiken, 2010; Bertram, 2008)

Genus *Salmonella* delas upp i två arter: *Salmonella enterica* och *Salmonella bongori* (Reeves et al, 1989, Minor et al, 1987). *Salmonella enterica* i sin tur är uppdelad i 6 underarter: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* och *S. enterica* subsp. *indica* (Minor et al, 1987). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* är i sin tur uppdelade i serovarer baserat på värmestabila somatiska LPS (O-antigen), flagellin (H-antigen) och värmekänsliga kapsel antigen (Vi-antigen) (Popoff et al, 1997; Whitte 1926; Mader, 2006). Alla serovarer anses patogena för människa men dosen som krävs för utvecklande av sjukdom varierar (Foley et al, 2007; Olsen, 2005; Morgan et al, 1994; Vought et al, 1998). Det finns över 2400 olika serovarer av *Salmonella* och de flesta är inte artspecifika (Olsen, 2005; Woodward et al, 1997). Hädanefter kommer salmonella som hör till underarten Enteritidis anges endast med serovarnamn, t.ex. *Salmonella* Fluntern. Övriga underarter skrivs med sitt fulla namn.

Bakteriens naturliga habitat är tarmarna hos både varmblodiga och kallblodiga ryggradsdjur men den har god överlevnad i miljön och kan föröka sig utanför tarmen (L. Bauwens et al, 2006; Woodward et al, 1997). Vanligen sker det dock inte någon betydande förökning i miljön (Forshell et al, 2006). Salmonellabakterien kan överleva mer än 89 dagar i kranvatten och 30 månader i reptilavföring (Mermin, 1997).

Salmonellos hos människor

Salmonellos

Salmonella enterica är en globalt spridd zoonos som är en av de vanligaste orsakerna till matförgiftning i USA och Europa (Thorns, 2000; Forshell, 2006, EFSA, 2012).

I Sverige är salmonellos anmälningspliktig och ca 4000 humanfall rapporteras in till Smittskyddsinstitutet varje år. Ca 85 % är utlandssmittade och då vanligen av *S. Enteritidis* som utgjorde 46 % av fallen under 2010 (SMI, 2011; SMI statistik, u.å.). Under 2010 rapporterades det i Sverige totalt 3609 fall av salmonellainfektion och av dessa var 830 (23 %) inhemska fall. *Salmonella* Typhimurium är den vanligaste serovaren vid inhemska fall och stod för 29 % av fallen (SMI statistik, u.å.).

De två humanspecifika serovaren *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi och Paratyphi ger typhoid feber som är en allvarlig sjukdom unik för dessa serotyper (SMI, 2011; Foley et al, 2007).

Patofysiologi

Vanligen sprids salmonella fekalt-oralt via livsmedel, men även direkt eller indirekt kontakt med infekterade djur och människor kan leda till infektion (Friedman et al, 1998; SMI, 2011; Pedersen, 2009). Infektionsdosen är oftast hög, mer än 100 000 bakterier, men en studie har visat att infektionsdosen kan vara så låg som 30 bakterier (Morgan et al, 1994; Vought et al, 1998). Antal bakterier som krävs för att utveckla sjukdom hos människa varierar beroende på b.l.a. smittkälla (exempelvis feta livsmedel tycks kunna sänka infektionsdosen), salmonellaserovar och immunstatus hos individen (SMI, 2011; Foley et al, 2007; Olsen, 2005).

Salmonella som överlever magsäckens låga pH kan kolonisera alla delar av tarmen och bakterien fäster till tarmväggens epitelceller med hjälp av fimbriae (rörligt fingerlikt utskott) eller pili (tubliknande utskott) på sin yta (Foley et al, 2007; Lawrence, 2000). När den fäst till epitelcellen utsöndrar bakterien proteiner som ruggar upp cellens yta och släpper in den i cellen. Epitelcellen bildar då en vakuol runt salmonella vilket ger bakterien ett skydd och möjlighet att föröka sig. Proteinerna som ruggar upp cellytan kallas SopB och är viktiga för bakteriens förmåga att invadera epitelcellerna. De stimulerar cellens sekretoriska egenskaper samt drar till sig neutrofiler vilket ger en lokal inflammation. SopB verkar även påverka cellens jonbalans vilket ytterligare stimulerar cellens sekretion till tarmlumen. Vid systemisk sjukdom har bakterierna invaderat immunceller såsom makrofager eller dendritiska celler som bär dem till andra organ i kroppen. Salmonella verkar inte föröka sig i immuncellerna utan infekterar den vävnad som immuncellen vandrat till och förökar sig där. Vilka symptom patienten får beror på vilket organ som är drabbat (Foley et al, 2007)

Symptom

Infektion med *Salmonella* spp. ger vanligen en okomplicerad gastroenterit med sekretorisk diarré, magsmärter, kräkning och feber (Olsen, 2005; Foley et al, 2007). Inkubationstiden är 6 – 72 timmar och infektionen självläker vanligtvis efter 2 – 7 dagar (Foley et al, 2007). Utsöndringen av bakterier är störst i början av infektionen och minskar med tiden. Vissa blir dock symptomlösa bärare och kan utsöndra salmonella 3 månader efter symptomfrihet. I en del fall utvecklar patienten aldrig sjukdom utan blir direkt symptomlös bärare (Forshell et al, 2006).

Systemisk sjukdom är ovanlig vid icke-typhoid salmonellos, drabbar vanligen små barn, äldre samt immunosupprimerade personer och är mycket sällan dödlig (Forshell et al, 2006). Exempel på symptom vid systemisk sjukdom är osteomyelit, pneumoni och meningit (Foley et al, 2007).

Reptil associerad salmonellos

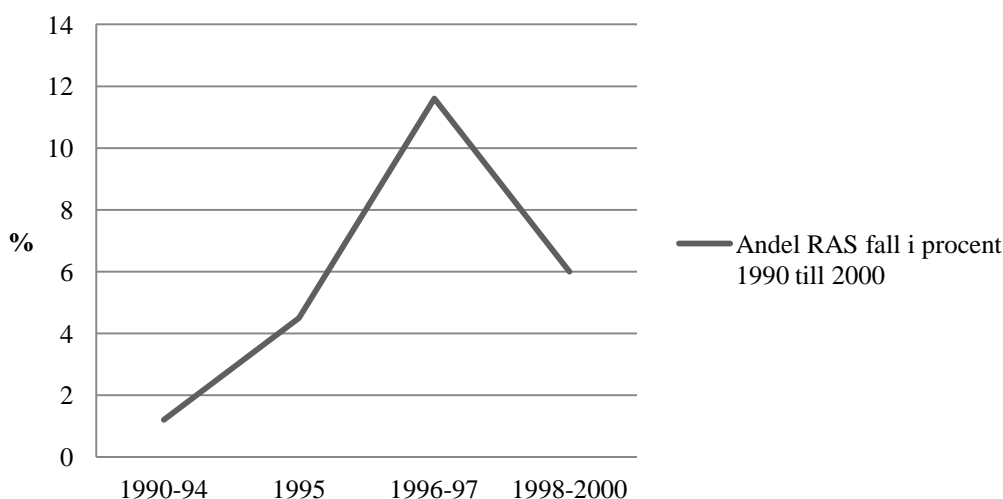
Med reptil associerad salmonellos (RAS) menas de fall där en patient med salmonellos har haft direkt eller indirekt kontakt med en reptil och ingen annan källa till infektionen misstänks (de Jong et al, 2005). I enstaka fall har man hittat källan till smitta hos en reptil i hushållet (EPI aktuellt, 2009; Cooke et al, 2009) Små barn är den mest utsatta gruppen för RAS och de smittas oftast av sköldpaddor, troligen för att ödlor och ormar oftare köps av vuxna medan sköldpaddor ges till barn som husdjur (de Jong et al, 2005). I en engelsk fall-fall studie fann man att barn under 5 år löpte en större risk att få salmonellos vid kontakt med reptiler än äldre barn, medan inget samband med reptilkontakt och ökad risk för salmonellos kunde säkerställas för vuxna över 20 år (Aiken et al, 2010).

Människor smittas med salmonella antingen genom direkt kontakt med reptilen, dess avföring, eller genom indirekt kontakt med kontaminerad miljö (Bauwens et al, 2006). Handtvätt efter kontakt med reptiler och deras miljö sänker risken att få RAS (Friedman, 1998).

RAS i Sverige

Sedan ett stort utbrott av salmonellos i Sverige på 1950-talet har Sverige haft ett kontrollprogram som mellan 1970 och 1994 inkluderade import av reptiler. För att få importera reptiler krävdes ett intyg på att de var fria från salmonella och sköldpaddor med ett skal under 10 cm fick inte importeras över huvudtaget. År 1995 gick Sverige med i EU vilket fick som resultat att sedan 1 mars 1996 upphörde importrestriktionerna. Detta bidrog sannolikt till den dramatiska ökning av antalet RAS fall som kunde ses 1996. Från 5-16 fall per år 1990 – 1994 till 25 fall 1995 och 139 fall 1996 – 1997. Efter en informationskampanj under 1997 sjönk andelen RAS (se diagram 1) till 123 fall 1998-2000 men har inte nått ner i de nivåer som sågs före 1995 (de Jong et al, 2005). Under senare delen av 2000-talet har bara ett tiotal RAS-fall per år rapporterats in. (EPI-aktuellt, 2009).

*Diagram 1. Andel RAS fall av totala antalet fall i procent
1990 till 2000*



Källa: de Jong et al, 2005

Mellan 1990 och 2000 rapporterades totalt 339 RAS i Sverige, av dessa var *Salmonella* Enteritidis den vanligaste serovaren (24 %) och *Salmonella* Typhimurium näst vanligast (9 %), övriga fall var smittade med mer exotiska serovarer som man vanligen associerar med reptiler (de Jong et al, 2005)

Under 2009 hade Sverige ett fall av konfirmerad salmonellasmitta från reptil och ytterligare ett fall med stark misstanke. I båda fallen rörde det sig om smitta från sköldpaddor. Det rapporterades in ytterligare sex fall samma år där personer smittade med salmonella hade reptiler i hemmet. I dessa fall spårade man dock inte smittan. (EPI-aktuellt, 2009).

Salmonella hos reptiler

Salmonella isolerades från reptiler (se figur 1 för exempel på reptiler) för första gången under 1940-talet (Hinshaw et al, 1945, McNeil et al.1946; Hinshaw et al.1947). Bakterien är förhållandevis vanligt förekommande hos reptiler även om studier på reptiler i fångenskap visar varierande resultat (se tabell 1). Vanligen är en reptil infekterad med bara en serovar men det förekommer att en individ bär på flera olika serovarer (Onderka et al, 1985; Burnham et al, 1998). Att fastställa om en reptil bär salmonella eller inte kan vara svårt då reptiler utsöndrar bakterien intermittent i sin avföring (Burnham et al, 1998). Det finns indikationer på att förekomsten varierar beroende på reptiltyp men de olika studierna får olika förhållanden mellan typerna (se tabell 2).

Tabell 1. Prevalensen av *Salmonella* hos reptiler i fångenskap i olika studier

Prevalens	Antal	Ursprung	Källa
12 %	197	Farmade sköldpaddor	Shane et al, 1990
13 %	1061	Zoo	Bauwens et al, 2006
14 %	173	Zoo	Goopee et al, 2000
14 %	14	Hushåll och djuraffär	Seepersadsingh et al, 1997
24 %	305	Hushåll	Ebani et al, 2005
37 %	311	Zoo	Cambre et al, 1980
46 %	150	Hushåll	Onderka et al, 1985
47 %	40-45	Farmade sköldpaddor	Siebling et al, 1984
54 %	159	Hushåll	Geue et al, 2002
100 %	13	Försöksdjur från djuraffär	Burnham et al, 1998

Tabell 2. Prevalensen av *Salmonella* hos olika reptiltyper

Ormar	Ödlor	Sköldpaddor	Källa
15 % (17/112)	--	10 % (4/40)	Goopee et al, 2000
--	--	44-47 %	Siebeling et al, 1984
51 % (?/91)	48 % (?/45)	7 % (1/14)	Onderka et al, 1985
--	--	12 % (23/197)	Shane et al, 1990
--	100 % (12/12)	--	Burnham et al, 1998
55 % (69/125)	36 % (46/129)	3 % (2/63)	Cambre et al, 1980

Det råder en stor diversitet bland *Salmonella* serovarer hos reptiler men i samtliga fall har de hört till arten *Salmonella enterica*. Flera av serovarena är så ovanliga

att de inte fått något namn (Pedersen et al, 2009). De vanligaste underarterna på reptiler är *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* och *diarizonae* medan de vanliga serovareterna i humanfall, *Salmonella Typhimurium* och Enteritidis, är ovanliga på reptiler (Mader, 2006). I en dansk studie (Pedersen et al, 2009) hittades dock flera vanliga humanfallsserovarer hos reptiler såsom *Salmonella Typhimurium* och Enteritidis samt *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*.

Det är gjort mycket få studier där man undersökt tänkbara källor till salmonellos hos reptiler men fekal-oral infektion anses mest trolig även om infektion vid parning (Hidalgo-Vila et al, 2007) och kontaminerad föda är sannolika källor (Pedersen et al, 2009). Det har dock inte hittats salmonella i fodret i de studier där detta undersökts (Mitchell et al. 2000; Cambre et al. 1980; Burnham et al. 1998).

Reptiler tycks infekteras tidigt med salmonella, troligen från moderdjurets avföring. Det har isolerats salmonella i bottensubstratet från kläckaren samt på äggskalen men inte i gulesäck, äggstockar eller äggledare vilket tyder på att de inte blir infekterade redan i ägget utan så snart de kläcks från äggskal och miljö (Mitchell et al, 2000). I ett försök på farmade sköldpaddor sänktes frekvensen av salmonella hos de nykläckta sköldpaddorna från över 40 % ner till mellan 0 % och 1,12 % genom att först desinfektera äggen och sedan doppa dem i gentamicinsulfat-lösning och kläcka dem i en sanerad kammare (Siebeling et al, 1984).

Infekterade reptiler visar sällan kliniska symptom, men när de gör det ses ofta allvarlig sjukdom (Pederson et al, 2009; Onderka et al, 1985). I dessa fall ses vanligen allvarlig subakut, nekrotiserande enterit som kan förekomma i hela tarmen men är vanligast i den främre delen. Infektionen kan ge septikemi som leder till subakut hepatit, ibland med granulombildning i levern. Andra symptom hos reptiler kan vara pneumoni, myokardit, endokardit och nefrit (Onderka et al, 1985)



Figur 1. Skäggagam (*Pogona vitticeps*) och Majsorm (*Pantherophis guttatus guttatus*).
Foto Veronica Orell Vikström.

Salmonellos hos däggdjur

Salmonella hos våra sällskapsdjur och livsmedelsproducerande djur ger vanligen subklinisk sjukdom av varierande längd men kan beroende på serovar, djurart och individ leda till kliniska symptom. Våra djur utgör en smittorisk till människor

framför allt i livsmedelskedjan men även genom direkt och indirekt kontakt med infekterade djur (Forshell et al, 2006).

De mer artspecifika serovaren (se tabell 3) var de första man isolerade hos djur med kliniska symptom men idag är det vanligast att man isolerar andra serovarer som kan ge sjukdom hos både människor och djur. De artspecifika serovaren är anpassade för ett djurslag och anses mindre patogena för andra djurslag samt människor, men i de fall människor har blivit infekterade orsakar de ofta allvarlig septikemi. Vanliga symptom hos värdjuret vid infektion med de artspecifika serovaren är aborter eller kraftig gastroenterit.

Tabell 3. Exempel på artspecifika *Salmonella* serovarer hos djur.

Serovar	Djurart
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Abortus ovis	Får
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Cholerae suis	Gris
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Gallinarum	Fjäderfä
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Abortus equi	Häst
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Dublin	Nöt

Vid infektion med andra serovarer (se tabell 4) är det vanligt med subklinisk sjukdom men vid kliniska symptom ses per akut septikemi samt akut eller kronisk enterit. De övriga serovaren är ovanliga hos djuren och ger inte kliniska symptom men är viktiga då de kan ge gastroenterit hos människa (Forshell et al, 2006)

Tabell 4. Exempel på *Salmonella* serovarer som vanligen isoleras från livsmedelproducerande djur.

<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Hadar
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Infantis

SYFTE

Målet med studien var att undersöka prevalensen av *Salmonella* spp. hos reptiler i våra svenska hushåll samt vilka serotyper som är förekommande.

Delmål var att

- a) utröna om det finns något samband mellan reptiltyp, födoval o.s.v. och isolerad serovar hos individen.
- b) jämföra två olika selektiva berikningsmedier; Modifierad Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) och Rappaport Vassiliadis buljong (RVS) med varandra avseende detektionskänslighet, dels generellt och dels mellan serovarer.

MATERIAL OCH METODER

De metoder för salmonellaisolering och odling jag använder följer NMKL (Nordisk Metodikkommité för Livsmedel) no 71 utgåva 5 samt NMKL no 187 2007. En etisk ansökan är godkänd av Djurförsöksetiska nämnden i Uppsala, Dnr C167/11.

Kontakt och information

Djurägarna som deltog i studien kontaktades genom inlägg i forum för reptilintresserade, genom kontakt med Sveriges Herpetologiska förening samt genom personliga kontakter.

Använda forum:

www.mypetbook.se

<http://reptinet.communityisland.com>

<http://www.geckos.forum24.se/>

<http://majorm.forum24.se/>

<http://www.reptisite.se/>

Djurägarna som var intresserade att delta i studien tog sedan kontakt genom email och fick därefter ett provtagningskit samt djurägarbrev (se bilaga 1) hemskickat med posten 1-2 veckor före inskickningsdatum. I kitet ingick provtagningsstopps i Amies medium (med eller utan kol), plastburk med lock, plastsked, remiss, returkuvert och provtagningsinstruktioner.

I och med inskickning av prover godkände djurägarna sitt deltagande i studien. Provtagningen gjordes 4-8 december 2011 och varje hushåll fick bidra med prover från max 10 terrarier. Alla arter, åldrar och kön av reptiler fick vara med i studien. Målet med urvalet var att få in prover från 100 stycken reptiler till studien.

Provtagning

En noggrann provtagningsbeskrivning medföljde provtagningskitet (se bilaga 2). Från varje terrarie togs ett miljöprov samt en kloaksvabb från en reptil. Samtliga prover har tagits av djurägarna själva. Kloaksvabben togs med en tops som antingen försiktigt fördes in i kloaken eller i de fall detta var svårt gnuggades mot kloaken. Två prover togs på färsk avföring. All prover märktes med nummer, metod (svabb i kloak, runt kloak eller färsk avföring), tid och datum för provtagning och förvarades i kolat eller okolat Amies medium (val efter tillgänglighet på material) under transport till labbet. Miljöproven togs antingen från bottensubstratet eller från vatten (i de fall bottensubstrat inte fanns) och förvarades i en plastburk märkt med nummer, tid och datum för provtagningen. Samtliga prover skickades med Posten och odlades inom 48 timmar från provtagningen, de flesta inom 24 timmar.

I samband med provtagningen fyllde djurägaren i en remiss som följde med i provtagningskitet. I remissen fick djurägaren lämna uppgifter om sig själv och om djuren där uppgifter om art, ålder och kön efterfrågades (se bilaga 3). Dessutom ställdes frågor kring djurets miljö och exponering så som utfodring, import, reptilarter i hushållet och huruvida djuret var friskt vid provtagningen. I remissen

fylldes även i vald provtagningsmetod för individprovet, vilket material som skickats in för miljöprovet och vilken tid proverna togs.

Preberikning

Topsen sattes i 10 ml buffrat pepton vatten (BPW) vilket inkuberades i 37 C° under 18 ± 2 timmar. Av miljöproverna togs 25g eller 25 ml som sattes i 225 ml BPW och inkuberades även de i 37 C° under 18 ± 2 timmar.

Motivering: Provmaterialet preberikas i BPW för att föröka antalet salmonellabakterier samt för att ge skadade bakterier en chans att återhämta sig vilket ökar chansen att hitta *Salmonella* i ett prov (Oxoid, CM0509; Minor et al, 1987). Anledningen till att BPW används beror på att *Salmonella* växer bra i medier som innehåller pepton (Minor et al, 1987) och att BPW har ett neutralt pH (Oxoid, CM0509).

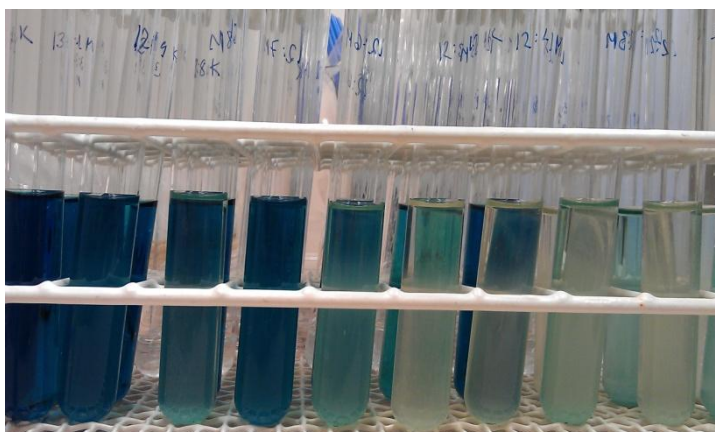
Anrikning

Två olika anrikningsmetoder användes parallellt för varje prov

1. 0,1 ml av BPW inokulerades i 10 ml förvärmad Rappaport-Vassiliadis Soya Pepton buljong (RVS, se figur 2) och inkuberades i 41.5 C° under 24 ± 1 timmar.
2. 0,1 ml av BPW droppades i 3 lika stora droppar på Modifierad semisolid Rappaport Vassiliadis medium (MSRV) plattan och inkuberades i 41,5° under 24 ± 1 timmar. Negativa plattor inkuberades i ytterligare 24 ± 1 timmar.

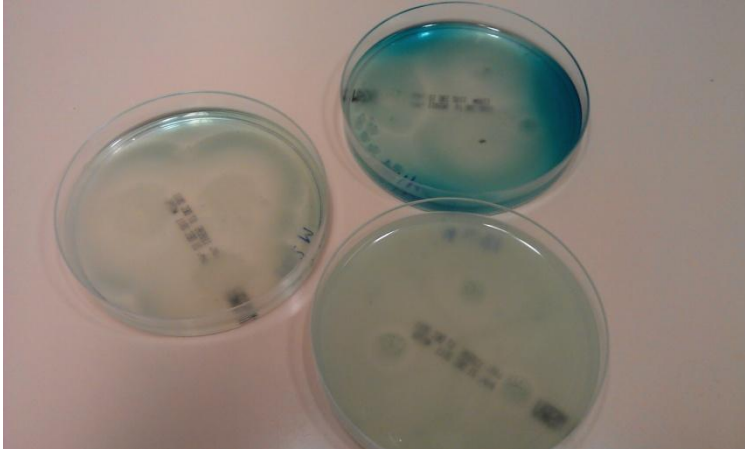
Motivering: När salmonellabakterierna återhämtat och förökat sig i BPW inokulerar man buljongen i ett selektivt medium. RVS buljong är att föredra (Bauwens et al, 2006) då den är sammansatt baserat på följande egenskaper hos *Salmonella* spp. (Oxoid, CM0866; Minor et al, 1987):

1. förmågan att överleva ett högt osmotiskt tryck
2. förmågan att föröka sig i lågt pH, RSV håller ett pH på 5,2 ± 0,2
3. relativt resistent mot malakit grönt
4. klarar sig på relativt näringsfattigt medium
5. växer bra i medier med pepton



Figur 2. RVS-rör efter inkubering. Foto Veronica Orell Vikström.

I denna studie har proverna även inokulerats på MSRVP-platta som har samma egenskaper som RVS-buljongen men där man ökar chanserna att hitta *Salmonella* då bakterien migrerar snabbare än andra motila gramnegativa bakterier i den semisolida agaren. Detta ger opaka zoner runt inokulationen (se figur 3) och man tar ett prov från utkanten på den opaka zonen för vidare odling (Oxoid, CM 1112).



Figur 3. Positiva MSRVP-plattor. Foto Veronica Orell Vikström.

Isolering

Två blå loopar (20 μ l) med RVS ströks ut på vardera XLD+N (Xylose Lysine Deoxycholate agar + Novobiocin) samt BG (Brilliant green) agarplattor och inkuberades i 37 C° under 24 \pm 3 timmar.

Material från positiva MSRVP-plattor tog med vit loop (1 μ l) från utkanten av den opaka zonen och ströks på XLD+N samt BG agarplattor som inkuberades 37 C° under 24 \pm 3 timmar.

Motivering: För att isolera salmonella används i denna studie både BG och XLD+N för att öka chansen att hitta salmonellabakterierna (se figur 4). HE (Hektoen Enteric) agar är det isoleringsmediet som i en studie gett bäst resultat (8/47 falskt negativa) men XLD ger bra resultat (11/47 falskt negativa) och kostar inte lika mycket att tillverka. BG är mer selektivt än XLD och gav i en studie därför fler falskt negativa (15/47) (Bauwens et al, 2006).

BG agaren har ett lågt pH (Oxoid, CM0866) samt innehåller bl.a. pepton som *Salmonella* spp. växer bra på (Oxoid, CM0263; Minor et al, 1987) och sackaros då *Salmonella* spp. inte producerar syra från sackaros och ger en negativ reaktion (Oxoid, CM0263; Minor et al, 1987). Agaren innehåller även färgämnet Brilliant Green som gett den sitt namn då salmonella har en relativt god motståndskraft mot detta färgämne (Oxoid, CM0866), samt fenolrött (Oxoid, CM0263) som används som pH-indikator där lågt pH ger gul färg och högt rött/rosa (Merck's index).

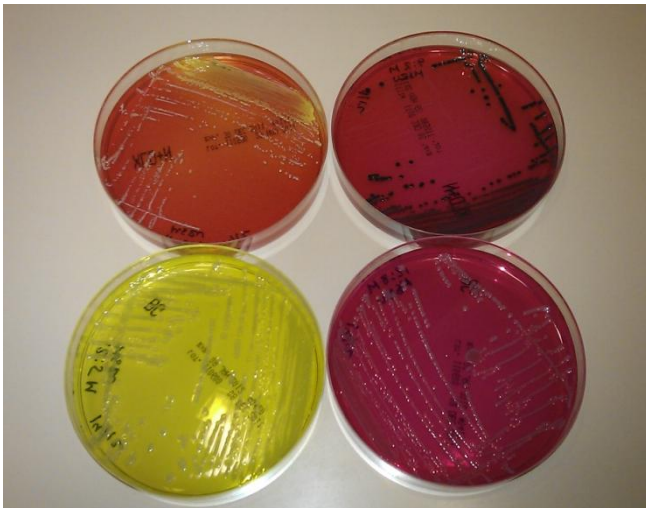
XLD agar differentierar *Salmonella* spp. och *Shigella* från andra icke-patogena bakterier. Detta görs genom fermentering av xylos, dekarboxylering av lysin samt produktion av vätesulfid (Oxoid, CM0469). I stort sett alla enteriska bakterier fermenterar xylos och tillsatsen av detta är gjord för att identifiera *Shigella* som

inte fermenterar xylos (Oxoid, SR0181; Oxoid CM0469). För att differentiera *Salmonella* spp. från andra enteriska bakterier är lysin tillsatt då *Salmonella* spp. fermenterar slut på xylosen och sedan dekarboxylerar lysinet vilket höjer pH till alkaliska nivåer efter fermenteringen av Xylos som ger en sänkning av pH (Oxoid, SR0181; BD, L007426).

För att kunna skilja *Salmonella* spp. från lysinpositiva koliformer har det tillsatts laktos och sackaros som de lysinpositiva koliformerna fermenterar vilket resulterar i ett lågt pH, *Salmonella* spp. fermenterar inte dessa sockerarter (BD, L007426).

För att ge ytterligare säkerhet i identifieringen av *Salmonella* spp. har thiosulfat och järn-ammonium-citrat tillsatts vilket ger en svärtning av kolonierna från H₂S-producerande bakterier såsom *Salmonella* spp. Icke-patogena H₂S-producerande bakterier dekarboxylerar inte lysin så det låga pH:t hindrar dem från att svärta agaren inom 18-24 timmar (Oxoid, SR0181; BD, L007426).

För att öka chanserna att hitta *Salmonella* spp. finns det hämmande substanser tillsatta som Natrium deoxycholat vilket inhiberar koliformer utan att påverka tillväxten av *Salmonella* spp. (Oxoid, CM0469) och novobiocin som hämmar tillväxten av grampositiva bakterier (Oxoid, SR0181, Moats, 1978).

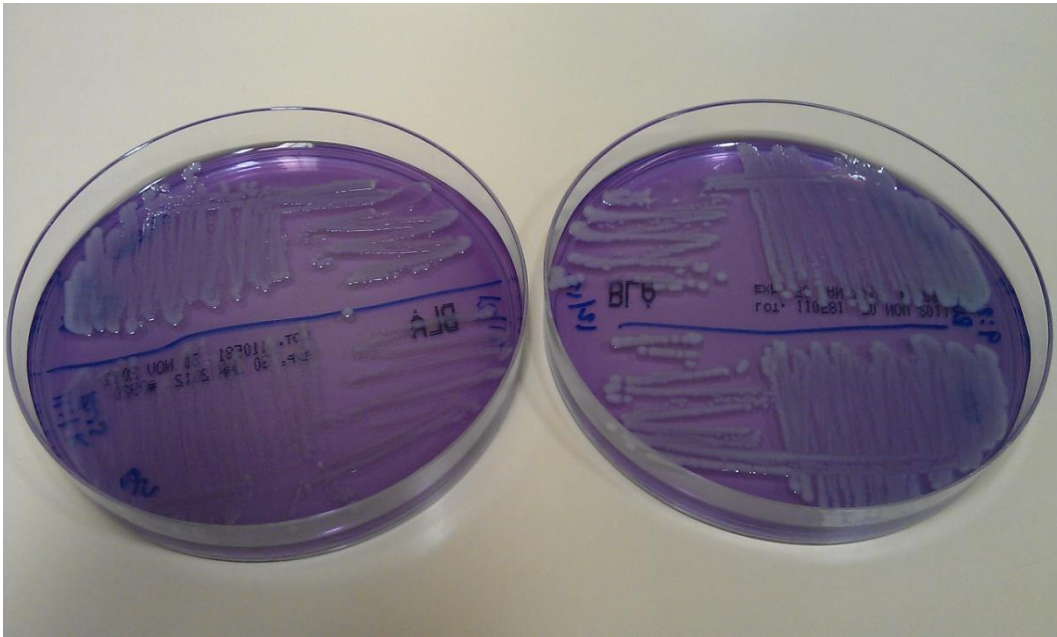


Figur 4. Uppe till vänster: salmonellanegativ XLD+N. Uppe till höger salmonellapositiv XLD+N. Nere till vänster salmonellanegativ BG. Nere till höger salmonellapositiv BG.
Foto Veronica Orell Vikström.

Identifiering

Kolonier som stämmer med genus *Salmonella* på XLD-N och BG agar konfirmeras med ett agglutinationstest efter att ha renstruktits på blågar (figur 5 illustrerar laktasnegativa salmonellakolonier) och inkuberats i 37 C° under 24 ± 1 timmar. Testet utförs med *Salmonella* spp. antisera – polyvalenta O (flera olika O-antigen i mix) samt H antigen. Dessa kan endast användas som en orientering (*Salmonella* spp. eller inte) då man måste använda specifika så kallade faktorsera för att fastställa art, underart och serovar. Det är viktigt att ha en negativ kontroll då vissa stammar spontanagglutinerar (Reagensia, 100-506).

Om bakteriekulturen som testas hör till genus *Salmonella* kommer antigenet att få bakterierna att agglutinera vilket ses som flockiga utfällningar (Reagensia, 100-506).



Figur 5. Typiska salmonellakolonier på blåagar. Foto Veronica Orell Vikström.

Kolonier som var positiva på både O-, och H-antigenen samt inte spontanagglutinerade i vattnet sparades i frysen. För kolonier där det bara skedde agglutinerings i det ena antigenet eller där reaktionen var osäker användes ett API-20E (Analytical Profile Index) för vidare identifiering. Detta test består av en remsa med 20 kammare som innehåller olika dehydrerade reagenser (se figur 6). Man fyller alla kammare med sin bakteriekultur suspenderad i fysiologiskt koksalt och en del kammare täcks sedan med mineralolja för att få en anaerob reaktion. API-20E testar bl.a. bakteriens förmåga att dekarboxylera vissa proteiner, fermentera olika sockerarter och producera H₂S (bioMérieux). Även alla prover som sattes på API-20E sparades i frysen.



Figur 6. Ett salmonellapositivt API 20E efter inkubering och tillsats av reagenser. Foto Veronica Orell Vikström.

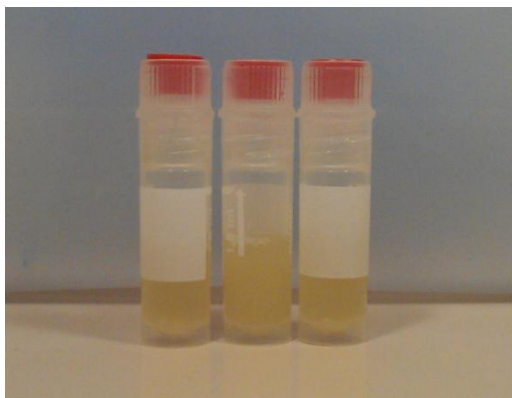
Serotypning

Salmonellapositiva kolonier ströks från fryst material till blåagar och inkuberades i 37 C° under 24 ± 1 timmar för att sedan skickas in till Statens Veterinärmedicinska Anstalt för serotypning.

Serotypning sker i två steg. Först kontrolleras att bakterien jäser olika sockerarter som en salmonella och vilken subspecie det tillhör. I steg två används ett agglutinationstest med en serie av olika antisera för att bestämma bakteriens O-fas och två H-faser. Bakteriens agglutinationsprofil avläses enligt White. Kauffmann-Le Minor för att bestämma vilken serovar det är (Melin, SVA; Foley et al, 2007).

Lagring

Kolonimaterial från blåagarplattan suspenderas i 1,1ml Brain-Heart-Infusion (BHI, se figur 7) + 17 % glycerol och fryses sedan ner till -70 C°.



Figur 7. Tre behållare med BHI samt salmonellakolonier innan frysning. Foto Veronica Orell Vikström.

Motivering: BHI + 17 % glycerol är en näringsrik buljong baserad på kalvhjärna och nöthjärta. Avkoket (infusionen) av hjärta och hjärna ger bakterierna vitaminer, kolkällor och kvävekällor. Dextros är tillsatt som kolhydratkälla, salt för att ge rätt osmotiskt tryck och disodiumfosfat är tillsatt som buffert (Oxoid, CM1135; Neogen 7116).

Tillsatsen av glycerol skyddar bakterierna från att skadas vid infrysning och upptining (Howard, 1955).

Statistik

Fishers test användes för att undersöka skillnader mellan salmonella positiva respektive negativa individer och variablerna ålder, kön, ursprung och foder. Ett p-värde $<0,05$ bedömdes som signifikant. I de fall det inte fanns något värde i 2x2 tabellen (för variabeln ålder) lades faktorn 1 till i alla rutor, s.k. fudge faktor, för att möjliggöra analys.

RESULTAT

Salmonella isolerade från deltagande hushåll och terrarier

Totalt deltog 14 hushåll i studien och det skickades in 62 miljöprover samt 63 individprover från 20 olika reptilarter (se tabell 5). Då miljöprov saknades från ett terrarium är det terrariet uteslutet ur sammanställningarna baserat på terrarier men är inkluderat i de sammanställningar som berör individprover. Av de 14 deltagande hushållen var 11 (79 %) positiva för *Salmonella* spp. i ett eller fler terrarier.

Tabell 5. Deltagande hushåll.

Hushåll	Antal terrarier (provtagna)	Antal arter	Antal reptiler (provtagna)	Län
1	5 (5)	5	10 (5)	Uppsala
2	1 (1)	1	1 (1)	Södermanland
3	7 (7)	5	35 (7)	Dalarna
4	6 (6)	3	11 (6)	Stockholm
5	12 (9)	2	18 (9)	Stockholm
6	9 (3)	4	13 (3)	Östergötland
7	20 (10)	1	18 (10)	Jämtland
8	1 (1)	1	1 (1)	Östergötland
9	2 (1)	1	6 (1)	Stockholm
10	7 (3)	6	14 (3)	Västra Götaland
11	3 (3)	1	5 (3)	Värmland
12	20 (3)	3	25 (3)	Stockholm
13	17 (9)	5	19 (9)	Halland
14	1 (1)	1	1 (1)	Norrbottn

Den mest isolerade underarten i studien var *Enterica* och den mest isolerade serovaren *Fluntern*. Sammanlagt isolerades 5 underarter och 10 serovarer (se tabell 6). Tyvärr kan laboratoriet som serotypade proverna inte differentiera mellan serovarna *Java* och *Paratyphi B*, antigenuppsättning 4,5:b:1,2.

Ifrån terrarier med ormar isolerades *salmonella* i 96 % (24/25) av dem. Underarterna *Enterica* (50 %) och *Diarizonae* (41 %) dominerade medan de vanligaste serovarna var *Java/Paratyphi B* (35 %) och *Tennessee* (29 %). I 70 % (26/37) av terrarierna med ödlor isolerades *salmonella* och underarten *Enterica* (55 %) dominerade även hos dessa medan *Salamae* (22 %) var näst vanligast och *Fluntern* (45 %) den vanligaste serovaren.

Tabell 6. Isolerade underarter och serovarer samt fördelningen av dem på reptilfamiljerna.

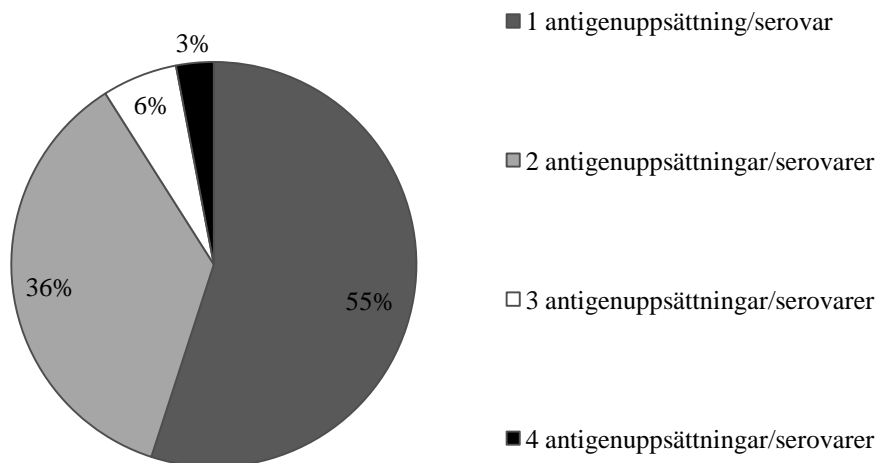
Underart	Serovar	Antal terrarier med underarten eller serovaren			Totalt
		Ormar	Ödlor	Sköldpaddor	
Arizonae		2	1	-	3
Diarizonae		14	4	-	18
Enterica		18	20	-	38
	Edinburg	-	1	-	1
	Fluntern	1	9	-	10
	Kentucky	2	1	-	3
	Kisarawe	-	2	-	2
	Muenchen	2	3	-	5
	Newport	1	-	-	1
	Tennessee	6	1	-	7
	Victoria	-	2	-	2
	Java/Paratyphi B	6	-	-	6
	Ej namngiven	-	1	-	1
	9:-:1,2				
Houtenae		-	3	-	3
Salamae		1	8	-	9
Totalt	10	35	36	0	71

De flesta hushållen (10/14) hade mer än en typ av salmonella (se diagram 2). Från hushållet med flest typer av salmonella isolerades 3 underarter och 5 serovarer av *Salmonella enterica* (se tabell 7).

Tabell 7. Isolerade Salmonella underarter och serovarer eller antigenuppsättningar uppdelat efter hushåll.

Hushåll	Antal terrarier (nr positiva)	Underarter (antigenuppsättning)	Enterica serovarer
1	5 (4)	Diarizonae (61:-:z53 + 48:-:1,5) Enterica	Kisarawe Java/Paratyphi B, 4,5:b:1,2
2	1 (1)	Enterica	Kisarawe
3	7 (6)	Diarizonae (O47) Enterica Houtenae (O44 + O51)	Edinburg Fluntern Kentucky Muenchen
4	6 (6)	Diarizonae (O16 + O42) Enterica Salamae (O30)	Kentucky Tennessee
5	9 (7)	Enterica Houtenae (O23 + O44) Salamae (O21 + O48)	Fluntern
6	3 (3)	Diarizonae (O50) Diarizonae (aggl. ej O-fas) Enterica	Newport Java/Paratyphi B
7	10 (9)	Arizonae (O53) Diarizonae (O16 + O44 + O47 + O48 + O53) Enterica	Pomona Tennessee Java/Paratyphi B
8	1 (0)		
9	1 (1)	Arizona (O23)	Fluntern
10	3 (2)	Arizona (aggl. Ej O-fas) Diarizonae (O57) Enterica	
11	3 (0)		
12	3 (3)	Enterica Houtenae (O18 + O30) Salamae (O6+O7+O9+O30)	Fluntern Ej namngiven, 9:-:1,2
13	9 (9)	Enterica Diarizonae (O18 + O60) Salamae (O6+O7+O9+O12)	Muenchen Tennessee Victoria Java/Paratyphi B
14	1 (0)		

Diagram 2. Fördelningen av antalet *Salmonella* antigenuppsättningar eller serovarer isolerade i terrarierna.



Salmonella isolerad från miljöprover

Totalt analyserades 62 miljöprover, varav 39 (63 %) positiva. Av miljöproverna avvek 40 stycken från standarden om 25 g provmaterial då för lite material skickades in. Av dessa var 26 (65 %) positiva för *Salmonella* spp, att jämföras med miljöproverna som följde standarden på 25 g provmaterial där 13 av 22 (59 %) var positiva. De vanligaste underarterna var enterica (41 st) och diarizonae (11 st) medan de vanligast isolerade serovarena var Tennessee (10 st) och Fluntern (9 st) (se tabell 8).

Salmonella isolerad från individprover

Totalt analyserades 63 individprover, varav 31 (49 %) positiva. Av individproverna var 26 kloaksvabbar varav 16 (61 %) var positiva för *Salmonella* spp., 36 svabbar i området kring kloaken varav 15 (42 %) var positiva och 2 prover var färsk avföring, båda dessa var negativa för *Salmonella* spp. De vanligast isolerade serovaren var Java/Paratyphi B (6 st) och vanligaste underarterna var enterica (21 st) och diarizonae (19 st) (se tabell 8).

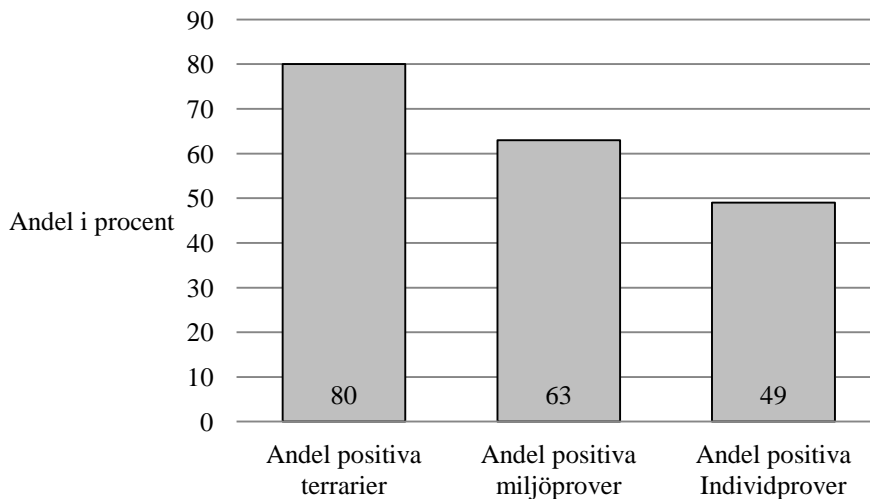
Tabell 8. Isolerade *Salmonella* underarter och serovarier eller antigenuppsättningar uppdelat efter reptil art.

Arter	Antal (nr positiva)	Isolerade underarter (antal)	Enterica serovarier (antal)
Agamer	7 (7)		
Pogona vitticeps	2 (2)	Enterica (3)	Kisarawe (3)
Pogona henrylawsoni	3 (3)	Enterica (3) Houtenae O23+O44(2) Salamae O21 (2)	Fluntern (2) 9:-:1,2 (1)
Uromastyx achantinura	1 (1)	Arizonae O23(2)	
Physignathus cocincius	1 (1)	Diarizonae 61:-:z53(1)	
Geckos	27 (20)		
Goniurosaurus luii	1 (1)	Enterica (2)	Muenchen (2)
Eublepharis macularius	19 (13)	Diarizonae O16 Enterica (15) Houtenae O18+O30+O44(2) Salamae O9+O30+O48(6)	Edinburg (1) Fluntern (13) Kentucky (1)
Rhacodactylus ciliatus	2 (2)	Enterica (3) Houtenae O44+O51(3)	Muenchen (3)
Nephurus milii	1 (1)	Enterica (2)	Tennessee (2)
Phelsuma madagascarensis grandis	1 (0)		
Pachydactylus turneri	3 (3)	Enterica (2) Salamae O9+O12(2)	Victoria (2)
Pytonormar	5 (5)		
Morelia bredli	1 (1)	Diarizonae O50(4)	
Morelia spilota harrisoni	2 (2)	Diarizonae Aggl. ej O-fas (1) Diarizonae O50 (2) Enterica (2)	Newport (1) Java/Paratyphi B (1)
Python regius	2 (2)	Diarizonae O60 (2) Enterica (4)	Java/Paratyphi B (4)
Boaormar	2 (2)		
Lichahura Trivittgata	1 (1)	Arizonae Aggl. ej O-fas (1) Diarizonae O57 (1)	
Epicrates cenchria cenchria	1 (1)	Diarizonae O60 (1)	
Snokar	18 (17)		
Panterophis guttatus guttatus	17 (16)	Arizonae O53(1) Diarizonae 48:-:1,5, O16+O42+O44, O47+O48+O53(11) Enterica (20)	Fluntern (1) Kentucky (3) Muenchen (2) Pomona (1) Tennessee (8) Java/Paratyphi B (5)
Lampropeltis triangulum nelsoni	1 (1)	Enterica (4)	Muenchen (4)
Övriga	3 (0)		
Timon lepidus	1 (0)		
Testudo horsfieldii	1 (0)		
Iguana iguana	1 (0)		

Jämförelse mellan individprover och miljöprover

Hos 50 (80 %) av de 62 deltagande terrarierna isolerades en eller flera underarter av salmonella på individprovet och/eller miljöprovet (se diagram 3). Varje individ, - och miljöprov sattes på både RVS och MSRV så upp till 2 underarter eller serovarer per prov kunde identifieras i denna studie.

Diagram 3. Fördelningen av *Salmonella* positiva terrarier, miljö-, och individprover.

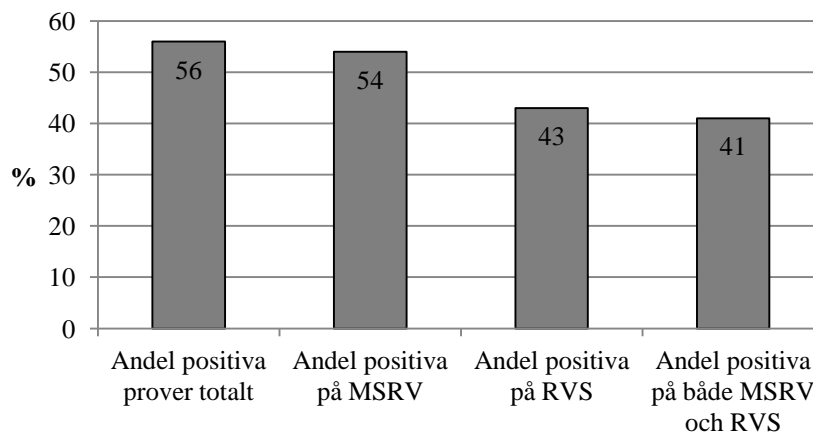


Jämförelse mellan MSRV och RVS

Totalt odlades 113 prover på MSRV varav 61 (54 %) var positiva och 125 (tolv sattes endast på RVS) prover på RVS varav 57 (45,5 %) var positiva.

Resultaten av de 113 prover som sattes på både MSRV och RVS redovisas i diagram 4.

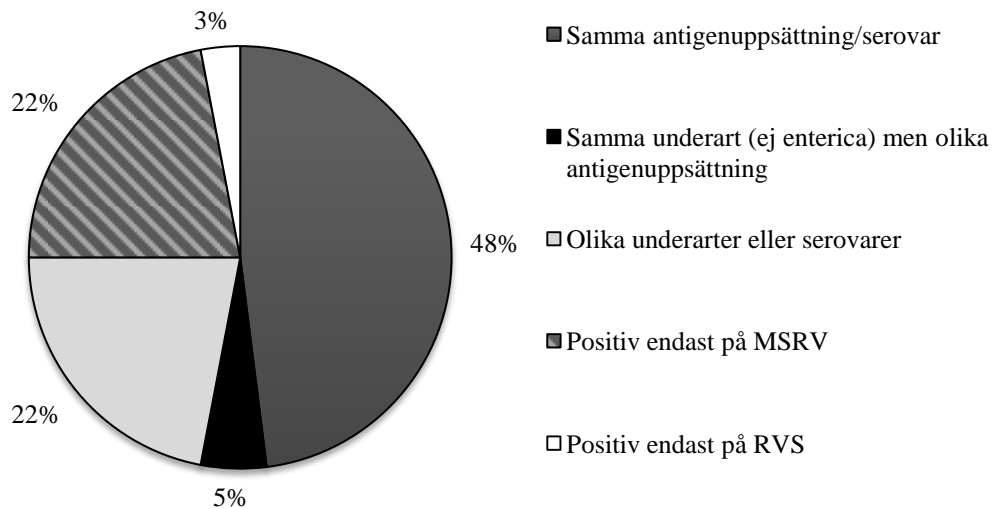
Diagram 4. Fördelningen av de 63 *Salmonella* positiva prover odlade på MSRV och RVS.



Serovaren Newport (1 isolat) och Victoria (2 isolat) isolerades enbart på MSRV, dessa prover var positiva även på RVS men med andra underarter/serotyper. Underarterna Kisarawe (2 isolat, sattes endast på RVS), Edinburg (1 isolat) och Pomona (1 isolat) isolerades enbart på RVS, dessa prover var positiva även på

MSRV men med andra underarter/serotyper. På 30 av proverna (48 %) hittades samma antigenuppsättning/serovar på RVS och MSRV (se diagram 5).

Diagram 5. *Fördelningen av isolerade Salmonella underarter och serovar eller antigenuppsättningar från reptiler på MSRV och RVS.*



Demografiska data

Beskrivning av de provtagna reptilernas ursprung, ålder, utfodring, kön och reptil typ finns beskrivet i tabell 9.

Fishers test visade att ingen signifikant skillnad i salmonella förekomst kan ses baserat på utfodring, ursprung, ålder eller kön, dock ses en signifikant högre förekomst hos ormar jämfört med ödlor ($p=0,02$).

Tabell 9. *Förekomsten av salmonella hos olika demografiska grupperingar av reptiler*

Variabel	Svarsalternativ	Antal positiva (%)	Totalt antal
Foder	Karnivor, endast gnagare	24 (96)	25
	Karnivor	19 (76)	25
	Omnivor	8 (80)	10
	Herbivor	0 (0)	2
Ursprung	Import	14 (92)	15
	Privat uppfödare	26 (81)	32
	Zoobutik	4 (67)	6
Ålder	< 1 år	11 (100)	11
	1-6 år	34 (81)	42
	> 6 år	6 (75)	8
Kön	Okänt	7 (86)	6
	Hane	16 (84)	19
	Hona	29 (80)	36
Reptiltyp	Orm	24 (96)	25
	Ödla	26 (70)	37
	Sköldpadda	0 (0)	1

DISKUSSION

Idag hålls ett ökande antal reptiler som sällskapsdjur, ofta i familjer med yngre barn. Detta leder till nära kontakt mellan reptil och människa och därmed ökad risk för smittöverföring. Med detta i åtanke känns det viktigt att genomföra studier som denna för att bättre kunna uppskatta risker kring reptiläggande. De fakta vi har i dagsläget tyder på att salmonella hos reptiler inte är av någon större betydelse för folkhälsan men det kan ändras om deras popularitet som sällskapsdjur växer. Denna studie kom fram till en förekomst av salmonella i 80 % av terrarierna men då salmonella utsöndras intermittent är detta sannolikt en låg uppskattning även om miljöproverna fångat upp en del av de reptiler som annars hade varit negativa.

Det har flertalet gånger fastställts att människor kan bli smittade med salmonella från reptiler men under begreppet RAS samlas många fall som sannolikt inte smittats av reptiler (EPI aktuellt, 2009; Cooke et al, 2009). Av de 339 fallen RAS som rapporterades in under perioden 1990-2000 i Sverige var 33 % smittade med serovaren Enteritidis och Typhimurium vilka inte isolerades i denna studie (de Jong et al, 2005). Detta gör det svårt att uppskatta och övervaka problemet och en ökad kännedom om vilka serovarer som förekommer hos reptilerna kan minska antalet felaktiga RAS-rapporteringar.

Idag anses salmonella höra till reptilers permanenta normalflora. Detta antagande tycks härröra från den höga förekomsten som hittats i flertalet studier (Burnham et al, 1998; Geue et al, 2002; Siebling et al 1984). Ingen signifikant skillnad mellan de olika demografiska grupperna kan ses i denna studie annat än att ormar har en signifikant högre förekomst av salmonella än ödlor. Mängden material i denna studie är dock begränsat så en större studie skulle kunna få fram fler signifikant skillnader i de demografiska grupperna. I denna studie minskar andelen positiva djur med åldern och det skulle vara mycket intressant att utöka studien och se om det faktiskt finns signifikanta skillnader. Kan man se en minskande förekomst med ökande ålder skulle det kunna tyda på att reptiler faktiskt kan göra sig av med salmonella och att den då inte har etablerat sig som normalflora. Vore salmonella normalflora borde förekomsten vara samma i alla åldrar, eventuellt till och med öka med åldern.

Det är inte osannolikt att salmonella sprids vertikalt. Flera studier har analyserat reptilernas foder med avseende på salmonella men inte hittat något (Cambre et al, 1980; Burnham et al, 1998; Mitchell et al, 2000). Salmonella har isolerats på äggskal och i äggläggningslådans substrat och dagsgamla reptiler har visat sig positiva för salmonella (Mitchell et al, 2000). Om salmonella förs vidare från moderdjuret till ungarna skulle det förklara de möjliga preferenser som ses hos vissa underarter och serovarer i denna studie. Det går i dagsläget inte utesluta att preferensen beror på habitat, foderval eller annan miljö eller genetisk faktor hos reptilen då denna studies material var så litet. För att få svar på detta skulle man behöva provta moderdjuret och hennes ungar samt få in fler prover från reptiler i olika miljöer och med olika utfodring.

Vill man utföra en studie på förekomsten av salmonella hos reptiler bör man ta både miljö och individprover då detta ökar sensitiviteten. Mängden material som

tas till miljöproverna tycks inte vara av stor vikt medan det däremot tycks vara viktigt att ta svabbprovet i kloaken för högsta sensitivitet. Lämpligen tas åtminstone tre prover vid skilda tillfällen för att ytterligare öka sensitiviteten i metoden på grund av den intermittenta utsöndringen.

Vid val av medium bör man välja MSR/V före R/VS då MSR/V har en högre sensitivitet för de underarter och serovarer som är vanliga hos våra svenska sällskaps/hobby reptiler. I denna studie kan ingen skillnad i känslighet beroende på salmonella underart eller serovar ses så vid val av medium behöver ingen hänsyn tas till vilken underart eller serovar som förväntas finnas. Man bör även ta mer än en koloni vidare för analys då hälften av terrarierna hade mer än en sorts salmonella om målet med studien är att undersöka vilka underarter och serovarer som förekommer.

Sammanfattningsvis finns det mycket kvar vi inte vet om salmonella på reptiler. Det hade varit mycket intressant att utöka denna studie för att få en säkrare uppskattning av förekomsten, vilka serovarer som vi har i Sverige och eventuella skillnader mellan de demografiska grupperna. Med tanke på de lyckade försöken att minska förekomsten av salmonella hos farmade sköldpaddor vore det även intressant att utföra ett liknande försök hos våra äggläggande reptiler samt försöka spåra smittan bakåt i släktleden (Siebling et al, 1984). Är det försöket lyckat vore det inte omöjligt att kraftigt minska förekomsten av salmonella hos våra reptiler med ett frivilligt kontrollprogram.

Jag hoppas att denna studie ökat förståelsen för salmonella hos reptiler och ökat intresset för ämnet. Det är min förhoppning att denna studie ska bli starten till fler och lite större studier i ämnet, det finns många frågor som fortfarande är obesvarade.

Stort tack till

Sofia Boqvist
Lise-Lotte Fernström
Deltagande djurägare
Statens Veterinärmedicinska Anstalt

KÄLLFÖRTECKNING

Artiklar

- Aiken A.M., Lane C., Adak G. K. 2010. Risk of Salmonella infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. *Euro Surveill.* 2010;15 (22):pii=19581.
- Bauwens L., Vercammen F., Bertrand S., Collard J-M., De Ceuster S. 2006. Isolation of Salmonella from environmental samples collected in the reptile department of Antwerpen Zoo using different selective methods. *Journal of Applied Microbiology* 101 (2006) 284-289
- Burnham B.R., Atchley D.H., DeFusco R.P, Ferris K.E, Zicarelli J.C, Lee J.H, Angulo F.J. 1998. Prevalence of fecal shedding of Salmonella organisms among captive green iguanas and potential public health implications. *J Am Vet Med Assoc* 1998 Jul 1;213(1): 48-50
- Cambre R.C., Green D.E., Smith E.E., Montali R.J., Bush M. 1980. Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980 Nov 1;177(9):800-3
- Cooke F.J., De Pinna E., Maguire C., Guha S., Pickard D.J., Farrington M., Threlfall E.J. 2009. First report of Human infection with Salmonella enterica Serovar Apapa Resulting from Exposure to a Pet Lizard. *J. Clin. Microbiol.* Aug 2009, p 2672-2674 (Vol 47, No 8)
- Dexter H. Howard. 1956. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *J. Bacteriol.* 1956, 71(5):625.
- Ebani V.V., Cerri D., Fratini F., Meille N., Valentini P., Andreani E. 2005. Salmonella enterica isolates from faeces of domestic reptiles and a study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *Research in Veterinary Science* 78 (2005) 117-121
- Foley S.L., Lynne A.M. 2007. Food animal-associated Salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.* 2008, 86:E173-E187
- Forshell L.P., Wierup M. 2006. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2006, **25** (2), 541-554
- Friedman CR, Torigian C, Shilliam PJ, Hoffman RE, Heltzel D, Beebe JL, Malcolm G, DeWitt WE, Hutwagner L, Griffin PM. 1998. An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. *J Pediatr.* 1998 May;132(5):802-7
- Geue L, Löschner U. 2002. Salmonella enterica in reptiles of German and Austrian origin. *Vet. Microbiol.* 2002 Jan 3;84(1-2):79-91
- Goopee N.V., Adesiyun A.A., Caesar K. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases* 2000 36(2);284-293
- Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniaqua C, de Frutos-Escobar C, Jiménez-Martínez C, Pérez-Santiqosa N, 1998. Salmonella in free living terrestrial and aquatic turtles. *Veterinary Microbiology*, Volume 119, Issues 2-4, 31 January 2007, Pages 311-315
- Hinshaw WR, McNeil E. 1945. Salmonella types isolated from snakes. *Am J Vet Res* 1945;6:264-6
- Hinshaw WR, McNeil E. 1947. Lizards as carriers of salmonella and paracolon bacteria. *J Bacteriol.* 1947Jun;53(6);715-718

- Jong de, B. 2005. Effect of Regulation and Education on Reptile-associated Salmonellosis. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 11, No. 3, March 2005.
- McNeil E, Hinshaw WR. 1946. Salmonella from Galapagos turtles, a Gilamonster and an iguana. *Am J Vet Res* 1946;7:62-3
- Mermin J, Iguanas and S. Marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics* 1997;99:399-402
- Minor L.L., Popoff M.Y. 1987. Request for an Opinion, Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bact.* 1987, **37**, 465-468
- Mitchell M.A., Shane S.M, 2000. Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas (*Iguana iguana*) and their environment. *Preventive Veterinary medicine* 45 (2000) 297-304
- Moats W.A., 1978. Comparison of Four Agar Plating Media with and Without Added Novobiocin for Isolation of *Salmonellae* from Beef and Deboned Poultry Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov 1987:747-751
- Morgan D., Mawer S.L., Harman P.L. 1994. The role of homemade icecream as a vehicle of *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection from fresh shell eggs. *Epidemiol. Infect.* 113:21-29.
- Onderka DK, Finlayson MC. 1985. *Salmonellae* and salmonellosis in captive reptiles. *Can J Comp Med* 1985 Jul;49(3):268-70
- Pedersen K., Lassen-Nielsen A-M., Nordentoft S., Hammer A.S. 2009. Serovars of *Salmonella* from captive reptiles. *Zoonoses Public Health*. 2009 Jun; 56(5):238-42
- Popoff, M.Y., Le Minor, L.E. 1997. Antigenic formulas of the salmonella serovars. 7. ed. Paris: WHO Collaborating Centre for referens and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute.
- Reeves M. W., Gracia M. Evins, Anwar A. Heiba, Brian D. Plikaytis and J. J. Farmer III, 1989. Clonal Nature of *Salmonella typhi* and Its Genetic Relatedness to Other *Salmonellae* as Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Proposal of *Salmonella bongori* comb. Nov. *J. Clin. Microbiol.* 1989, **27**, 313-320
- Seepersadsing N., Adeisiyun A. 2006. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. in Pet mammals, Reptiles, Fish Aquarium Water, and Birds in Trinidad. *J. Vet. Med. B* 50, 488-493 (2003)
- Shane, S.M., R. Gilbert, and K.S. Harrington. 1990. *Salmonella* colonization in commercial pet turtles (*Pseudemys scripta elegans*). *Epidemiology and Infection* 105:307-316
- Siebeling R.J., Caruso D., Neuman S. 1984. Eradication of *Salmonella* and Arizona Species from Turtle Hatchlings Produced from Eggs Treated on Commercial Turtle Farms. *Applied and Enviromental Microbiology*, Apr. 1984, p.658-662 (Vol. 47, No. 4)
- White, B. 1926. Further studies of the *Salmonella* group. *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser.* 103:3-160
- Woodward D.L., Khakhria R., Johnson W.M. 1997. Human Salmonellosis Associated with Exotic Pets. *Journal of Clinical microbiology*, Nov. 1997, p 2786-2790
- Vought K.J., Tatini S.R. 1998. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *J. Food. Prot.* 61:5-10

Internet

- EPI-aktuellt, vol. 8, nr 49 (3 december 2009): Salmonellasmitta associerad med reptiler
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA Journal 2012; 10(3):2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Produktbeskrivningar på CM0509, CM 0866, CM0329, CM0469, CM0055, CM1135, CM1112, CM0209 från www.oxoid.com
- Produktblad från Becton, Dickinson and Company – BD. L007426 – Rev. 09 – September 2007, [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007426\(09\)\(0907\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007426(09)(0907).pdf)
- Produktblad från bioMérieux sa - 07584D - GB - 2002/10 [http://www.netropica.org/bacteriologia/Api20E\(1\).pdf](http://www.netropica.org/bacteriologia/Api20E(1).pdf)
- Produktblad från Neogen Corporation - PI 7116, Rev 03, nov. 2010; PI 7268, Rev 04, april 2009 <http://www.neogen.com/>
- Produktblad från Reagensia AB. Salmonella antisera för objektglasagglutination (ART NO 100-506)
- Svenska Smittskyddsinstitutet, SMI 2011. <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/salmonellainfektion/>
- Svenska smittskyddsinstitutet, SMI statistik, u.å. <http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/salmonellainfektion/?t=com#statistics-nav>

Böcker

- Elmerdahl Olsen J. 2005. Studies of zoonotic salmonellae: Taxonomy, detection, typing and pathogenesis. 15, 63-74
- Lawrence E. 2000. Henderson's Dictionary of Biological Terms. 12th edition.
- Mader D.R. 2006. Reptile Medicine and Surgery. Second edition.
- Merck's index 11th ed 7213 + 13th ed 7329
- Riemann H.P., Riemann H., Cliver D.O. Foodborne infections and intoxications.

Intervjuer

- Kommunikation med Lennart Melin, Bitr statsveterinär/VMD, Enheten för Bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala, lennart.melin@sva.se

Bilaga 1 - Djurägarbrev

Studie om förekomst av Salmonella hos Svenska reptiler

Jag heter Veronica Orell Vikström och läser sista året på Veterinärutbildningen i Uppsala. Du får detta brev av mig eftersom du anmält intresse, via e-mail, att delta i en studie för att undersöka förekomsten av Salmonella hos svenska sällskapsreptiler. Studien utförs som mitt examensarbete som görs under det sista året på utbildningen.

Studiens bakgrund och syfte

Jag har själv ägt reptiler i över 10 år och har länge undrat om det verkligen finns Salmonella hos alla reptiler och i så fall var smittan kommer ifrån. Under förberedelserna inför examensarbetet har jag läst ett flertal vetenskapliga artiklar där man studerat ämnet. Förekomsten tycks variera kraftigt i de olika studierna (gjorda i olika länder och ofta på färre än 20 reptiler), allt från 12 % till 90 %. Dessa studier är dessutom gjorda på zoodjur och inte "sällskapsdjur".

Jag är intresserad av att ta reda på hur vanligt Salmonella är hos svenska reptiler i hushåll och vilka serotyper (underarter) av Salmonella det rör sig om. Får jag in tillräckligt stort material är jag även intresserad av att se om vissa grupper av reptiler har större förekomst av Salmonella än andra.

Fakta om studien

Jag kommer att sköta allt det praktiska i studien samt sammanställa resultatet och presentera det. Studien är helt frivillig och du som djurägare kan dra dig ur studien när som helst. Medgivande till att delta i studien sker genom att du skickar in ditt provmaterial och ifyllda remiss.

Salmonella är en anmälningspliktig sjukdom och därför kommer alla fynd att anmälas till Svenska Jordbruksverket (SJV), dock kommer inte SJV att vidta några uppföljande åtgärder eller rapportera detta vidare.

Provsvaret kommer att skickas ut skriftligt via e-mail eller brev. Detta väljer du själv i remissen. Vid fynd av salmonella hos din/dina reptiler kommer jag att finnas tillgänglig via telefon och e-mail för rådgivning och ev frågor. Resultaten från provtagningen kommer att behandlas anonymt och det kommer inte gå att spåra dig som djurägare när resultatet av studien presenteras. Om du är intresserad av studien kan jag skicka en kopia när den är klar, skriv då det i mailet.

Provtagningsanvisningar

För att begränsa mängden arbete kan jag bara ta emot prover från totalt 3 terrarier från varje djurägare. I varje terrarie tas ett svabbprov i kloaken från valfri reptil samt ett miljöprov. Om du ska skicka in flera prover numrera dem 1 till 3 på etiketten så jag vet vilket miljöprov som hör ihop med vilket svabbprov.

1. Kontrollera att du fått all utrustning i brevet:
 - Provtagningsstopps i Amies medium
 - Plasttub med lock
 - Plastsked
 - Remiss
 - Frankerat och adresserat returkuvert
2. Läs igenom instruktionerna noggrant innan du börjar. Det är viktigt att proverna tas samtidigt!
3. Använd plastsmeden, fyll burken med bottensubstrat, ta till synes rent substrat (ingen avföring i) från en skuggig plats i terrariet där reptilen normalt vistas. Förslut burken, skriv datum och tid för provtagningen på etiketten och lägg burken i returkuvertet. Släng skeden i brännbart.
4. Ta ut topsen ur förpackningen. För in spetsen av topsen i kloaken på reptilen tills all bomull är inne i kloaken men inte längre. Rulla försiktigt topsen ca 2 varv (åt samma håll) och dra den sedan försiktigt ut ur kloaken. Ta bort locket på behållaren som medföljer topsen och för ner spetsen i den svarta gelen så långt det går. Märk behållaren med provtagningsdatum, tid och provtagnings sätt. Sätt sedan ner behållaren i returkuvertet.

I undantagsfall kan det gå bra att ta ett prov på färsk avföring men kontakta i så fall mig för instruktioner. Detta provtagnings sätt ger större risk för falskt negativt svar än en kloaksvabb.

5. Fyll i remissen och lägg den tillsammans med provtagnings materialet i det bifogade returkuvertet. Kuvertet är frankerat och du behöver därför inte sätta på några frimärken.
6. Lägg sedan returkuvertet på posten samma dag så att det når labbet dagen efter (provtagning kan alltså inte göras fredag eller lördag). Prover som når labbet efter mer än 24 timmar kommer inte kunna användas i studien. Behöver du förvara provet i några timmar innan du postar det bör det förvaras svalt, helst i kylan.

Tack för ditt deltagande i studien!

Har du några frågor kan du kontakta mig eller min handledare docent Sofia Boqvist.

Veronica Orell Vikström, veterinärstudent
070-6412092

Salmonellastudie@hotmail.com

Sofia Boqvist, docent
018-672388
Sofia.Boqvist@slu.se

Bilaga 2 – Remiss

REMISS

Förekomsten av Salmonella hos Svenska Reptiler

Djurägaren

Namn: _____

Adress: _____

Län: _____

Kontakt för provsvar, tel. och mail: _____

Terrarium 1

Art (latin): _____

Kön: Hona Hane Okänt

Ålder: _____

Importerad? Ja Nej

Om Ja, vilket år och land? _____

Finns det en importerad reptil i samma terrarie? Ja Nej

Är djuret friskt? Ja Nej

Har djuret fått vara utomhus? Ja Nej

Var kommer djuret från? Zoobutik Privat uppfödare Okänt

Vad utfodras reptilen med?

Vad har det provtagna terrariet för bottensubstrat? _____

Provtagningsmetod (ringa in): Kloaksvabb Svabb runt kloaken
Miljöprov

Inskickat material till miljöprovet: _____

Provtagningsdatum samt tid: _____

Terrarium 2

Art (latin): _____

Kön: Hona Hane Okänt

Ålder: _____

Importerad? Ja Nej

Om Ja, vilket år och land? _____

Finns det en importerad reptil i samma terrarie? Ja Nej

Är djuret friskt? Ja Nej

Har djuret fått vara utomhus? Ja Nej

Var kommer djuret från? Zoobutik Privat uppfödare
Okänt

Vad utfodras reptilen med?

Vad har det provtagna terrariet för bottensubstrat? _____

Provtagningsmetod (ringa in): Kloaksvabb Svabb runt kloaken
Miljöprov

Inskickat material till miljöprovet: _____

Provtagningsdatum samt tid: _____

Terrarium 3

Art (latin): _____

Kön: Hona Hane Okänt

Ålder: _____

Importerad? Ja Nej

Om Ja, vilket år och land? _____

Finns det en importerad reptil i samma terrarie? Ja Nej

Är djuret friskt? Ja Nej

Har djuret fått vara utomhus? Ja Nej

Var kommer djuret från? Zoobutik Privat uppfödare
Okänt

Vad utfodras reptilen med?

Vad har det provtagna terrariet för bottensubstrat? _____

Provtagningsmetod (ringa in): Kloaksvabb Svabb runt kloaken
Miljöprov

Inskickat material till miljöprovet: _____

Provtagningsdatum samt tid: _____

Övrigt

Antal reptiler i hushållet: _____

Antal terrarier i hushållet: _____

Antal importerade reptiler i hushållet: _____

Vilka andra arter finns i hushållet? _____