

- Greño, J.L. 2011. Foto aportada al portal de Biodiversidad Virtual. <<https://www.biodiversidadvirtual.org/reptiles/Podarcis-sicula-img6780.html>> [Consulta: 28 septiembre 2020].
- Meijde, M. 1981. Una nueva población de *Lacerta sicula* Rafinesque para el norte de España. *Doñana, Acta Vertebrata*, 8: 304–305.
- Mertens, R. & Wermuth, H. 1960. *Die Amphibien und Reptilien Europas*. Verlag Waldemar Kramer, Frankfurt am Main.
- Ribeiro, R. & Sá-Sousa, P. 2018. Where to live in Lisbon: urban habitat used by the introduced Italian wall lizard (*Podarcis siculus*). *Basic and Applied Herpetology*, 32: 57–70.
- Rivera, X., Arribas, O., Carranza, S. & Maluquer-Margalef, J. 2011. An introduction of *Podarcis sicula* in Catalonia (NE Iberian Peninsula) on imported olive trees. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 19: 79–85.
- Senczuk, G., Colangelo, P., De Simone, E., Aloise, G. & Castiglia, R. 2017. A combination of long term fragmentation and glacial persistence drove the evolutionary history of the Italian wall lizard *Podarcis siculus*. *BMC Evolutionary Biology*, 17: 6.
- Valdeón, A., Perera, A., Costa, S., Sampaio, F. & Carretero, M.A. 2010. Evidencia de una introducción de *Podarcis sicula* desde Italia a España asociada a una importación de olivos (*Olea europaea*). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 21: 122–126.

## Primer diagnóstico de *Chlamydia* en tritón del pirineo (*Calotriton asper*) y tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*) vinculada al coleccionismo ilegal de anfibios

Albert Martínez-Silvestre<sup>1</sup>, Elena Obón<sup>2</sup> & Aïda Tarragó<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña (CRARC). 08783 Masquefa. Barcelona. España. C.e.: crarc@amasquefa.com

<sup>2</sup> Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa. Crta. B-140, Km 4'5. 08130 Santa Perpètua de Mogoda. Barcelona. España.

<sup>3</sup> Servei de Fauna i Flora. Direcció General Politiques Ambientals i Medi Natural. Departament de Territori i Sostenibilitat. Carrer de Provença, 204. 08036 Barcelona. España.

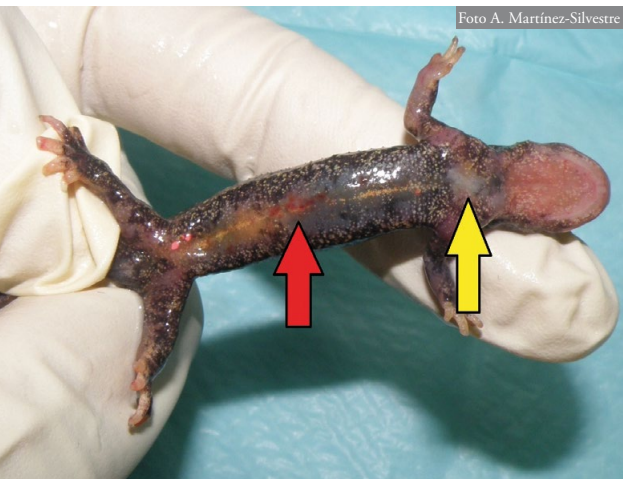
**Fecha de aceptación:** 24 de septiembre de 2020.

**Key words:** *Chlamydia*, emerging diseases, Montseny brook newt, Pyrenean brook newt.

Durante la primavera de 2020 se efectuó una intervención policial en una colección privada en Barcelona que mantenía anfibios urodelos. Las instalaciones poseían un gran número de especies, tanto exóticas como autóctonas ibéricas. Entre las especies autóctonas, se detectaron 31 ejemplares de tritón del Pirineo (*Calotriton asper*) y 10 ejemplares de tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en distintos acuarios. Ambas especies están protegidas e incluidas en el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del listado de Especies en Régimen de Protección Especial y el Catálogo Español de Especies Amenazadas, así como en el Decreto legislativo 2/2008, de 15 de abril, por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Protección de los Animales, por lo que su posesión particular está estricta-

mente prohibida. El tritón del Montseny (*C. arnoldi*) está además sujeto a un programa LIFE (LIFE15 NAT/ES/00757) de conservación *ex situ* e *in situ* de sus poblaciones. En consecuencia, todos los tritones fueron decomisados y trasladados a las instalaciones del CRARC y del Centro de Recuperación de Torreferrussa.

Los animales manifestaban evidentes signos de desnutrición y debilidad. Siguiendo el protocolo sanitario recomendado en urodelos en Cataluña (Martínez-Silvestre, 2019), se recogieron muestras cutaneas con hisopo para estudio mediante técnica de PCR de los patógenos *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Batrachochytrium salamandrivorans* y *Ranavirus*. Todos los animales dieron resultados negativos. Sin embargo, y ante el cuadro de progresivo adelgazamiento y debilidad, se



**Figura 1:** Petequias cutáneas (flecha roja) y áreas de despigmentación (flecha amarilla) en el área ventral de un *Calotriton arnoldi* positivo en *Chlamydia*. Se aprecia también el marcaje por elastómeros subcutáneos (dos puntos rosados) en el espacio inguinal.

decidió también tomar muestras para detectar mediante PCR *Salmonella* y *Chlamydia*, enfermedades descritas en urodelos cautivos en otros países y asociadas a la terrariofilia (Densmore & Earl-Green, 2007). Las muestras para estas determinaciones consistieron en hisopado cloacal de todos los animales decomisados de ambas especies. Las muestras, mantenidas en refrigeración, se remitieron al laboratorio para su estudio mediante técnica de PCR. Dicha PCR se realizó utilizando como PCR-Target el gen RNA ribosomal 23S, que detecta genéricamente todos los miembros de la familia Chlamydiaceae (Pantchev *et al.*, 2006). Los resultados fueron negativos para *Salmonella* pero positivos para *Chlamydia* en todos los animales. Para la confirmación de *Chlamydia*, descartar falsos positivos y al tener una población reproductora cautiva sanitariamente controlada, se decidió repetir el análisis, muestreando de nuevo a todos los tritones y esta vez añadiendo un grupo control negativo utilizan-

do para ello una pareja reproductora sana de *C. arnoldi* del Centro de Recuperación de Fauna de Torreferrussa. El resultado fue nuevamente positivo para todos los animales de las dos especies del género *Calotriton* excepto en los animales de la población control.

Entre uno y siete días después del decomiso murieron cinco *C. asper* y un *C. arnoldi*. A tres de estos animales se les pudo realizar necropsia e histología. Se tomaron muestras de vísceras internas (hígado e intestino) para confirmar *Chlamydia* mediante un nuevo PCR que resultó nuevamente positivo. El análisis histológico mostró congestión esplénica, si bien no permitió detectar otras lesiones específicas tisulares.

Durante el tiempo que duro el diagnóstico, el resto de animales manifestaron letargia, despigmentación irregular, Petequias cutáneas (pequeñas hemorragias puntuales) en áreas ventrales y digitales, y edema subcutáneo (Figura 1), todo ello coincidente con la patogenicidad descrita para *Chlamydia* en anfibios (Taylor *et al.*, 2001).

En base a los resultados obtenidos se decidió aplicar el tratamiento descrito para *Chlamydia* en anfibios (Taylor *et al.*, 2001). Todos los tritones fueron tratados mediante antibioterapia tópica (Doxiciclina; 5 a 10 mg/kg percutánea en gel o en baños) durante 2 periodos de 12 días separados por 14 días. A los 10 días del primer tratamiento, los *C. arnoldi* seguían desarrollando lesiones cutáneas que consistían en enrojecimiento de la piel, áreas de despigmentación y algunas Petequias cutáneas. Por ese motivo se decidió continuar con un tercer ciclo de antibioterapia de 12 días.

Tras este último tratamiento, los animales empezaron a ganar peso (incrementando en un 6% del peso en los 2 meses de tra-

tamiento; Figura 2). Tras 4 meses después del decomiso, un nuevo PCR de todos los animales dio resultados negativos. Los animales siguieron durante dos semanas incrementando su peso, con lo que se les consideró fuera de peligro. Sin embargo, esta bacteria forma cuerpos de persistencia, lo que hace muy difícil su erradicación a largo plazo y convierte a estos tritones en portadores irrecuperables.

*Chlamydia* es una bacteria sin pared celular, parásita intracelular obligada, que forma inclusiones intracitoplásmicas en las células infectadas (Densmore & Earl-Green, 2007). El animal enfermo manifiesta cuadros clínicos variables dependiendo de la especie de *Chlamydia* y del grado de afectación. Este cuadro puede incluir edema, letargia, anorexia, posiciones anormales y, en casos más avanzados, encefalomiелitis, ganglionitis, dermatitis, hepatitis o enteritis; llegando a ocasionar la muerte. Se ha descrito que también puede haber cuadros totalmente asintomáticos (Martel *et al.*, 2012). La detección de la enfermedad se confirma básicamente al unir la sintomatología con los resultados por PCR y la respuesta al tratamiento, ya que parece ser que en anfibios las lesiones macroscópicas (de necropsia) e incluso citológicas o histológicas no son características de clamidiosis si no se hace inmunohistoquímica (tinciones específicas utilizando anticuerpos monoclonales contra lipopolisacáridos de *Chlamydia*; Blummer *et al.*, 2007; Pessier, 2007).

Las observaciones realizadas en los tritones afectados en este caso hacen sospechar que las áreas de despigmentación cutánea se corresponden con el proceso de cicatrización de zonas que días antes estaban hemorrágicas. A las pocas semanas, en los animales curados, la despigmentación volvió a tener el color normal.



**Figura 2:** Aspecto de las lesiones tras tres semanas de tratamiento en el mismo tritón. Se aprecia menor enrojecimiento cutáneo, áreas blanquecinas cicatriciales y una mejoría en la condición corporal general del individuo.

Hasta el momento este agente tan solo se ha descrito en estado salvaje en anuros como *Mixophyes iterates* en Australia (Berger *et al.*, 1999) o *Rana temporaria* en Suiza (Blummer *et al.*, 2007) por lo que se considera una enfermedad emergente de riesgo en el resto del mundo que puede ser introducida asociada principalmente a liberaciones no controladas de anfibios (Félix, 2016). Dentro del género *Chlamydia* hay varias especies patógenas que pueden detectarse, si bien en anfibios la más común produciendo enfermedad es *Chlamydia pneumoniae* (Fratzke *et al.*, 2019). En Europa, se ha descrito un brote de mortalidad en Bélgica en salamandras cautivas (*Salamandra corsica* entre otras), por un tipo de *Chlamydia* que se ha propuesto como especie nueva (*Amphibiichlamydia salamandrae*) (Martel *et al.*, 2012). Cabe destacar que este género bacteriano también puede representar peligro de transmisión a personas, por lo que se considera, además, enfermedad de riesgo zoonótico. Hasta la realización de la presente nota, esta enfermedad no se había descrito aún para anfibios en España.

Es probable que la bacteria entrara en la colección a través de alguno de los múltiples tritones exóticos que estaban en las instalaciones contiguas a los decomisados y que carecían de unas mínimas medidas higiénico-sanitarias. Este caso es un ejemplo claro del elevado riesgo que existe de introducción de enfermedades emergentes a través del mercado ilegal de fauna salvaje y que pueden tener resultados devastadores si se propagan en libertad. La posesión de especies amenazadas como *C. asper* o en estado crítico como *C. arnoldi* sólo debe ser permitida en instalaciones oficiales, con los permisos correspondientes y cuando se justifique su posesión. La posesión de estas especies por mero coleccionismo debe ser perseguida, no sólo por su estado de protección legal sino, también, por la grave amenaza que puede representar para la conservación de estas especies la introducción de nuevas enfermedades en vida salvaje contraídas en cautividad.

Para terminar, se recomienda incluir la Chlamydiosis en los protocolos diagnósticos diferenciales de urodelos debilitados, y

la detección por PCR de *Chlamydia* en los análisis rutinarios de anfibios sintomáticos y debilitados.

**AGRADECIMIENTOS:** Los autores desean expresar su agradecimiento por la rápida respuesta y profesional actuación realizada en este caso por las siguientes personas y entidades: Al cuerpo de Bomberos de la Ciudad de Barcelona; Policía Local (Guardia Urbana) de Barcelona; URMA (Unitat Regional de Medi Ambient, Barcelona) y la ACME (Area Central de Medi Ambient) del Cos de Mossos d'esquadra; F. Carbonell, M. Alonso, R. Larios, R. Gutiérrez i D. Nicolau (Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrussa); R. Casanovas y V. Cadenas (Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya); Z. Alonso y J. Soler (CRARC); Laboratorios Laboklin (LABOKLIN, BadKissingen, Alemania); R. Velarde (Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona); J. Bosch y B. Thumsova (Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, Madrid) por su colaboración en las tareas diagnósticas. Este estudio ha estado cofinanciado por el programa Life Tritó del Montseny (LIFE15 / NAT/ES/000757) y Forestal Catalana (Generalitat de Catalunya).

## REFERENCIAS

- Berger, L., Volp, K., Mathews, S., Speare, R. & Timms, P. 1999. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iterates*) from Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2378–2380.
- Blumer, C., Zimmermann, D.R., Weilenmann, R., Vaughan, L. & Pospischil, A. 2007. Chlamydiae in free-ranging and captive frogs in Switzerland. *Veterinary Pathology*, 44: 144–150.
- Densmore, C.L. & Earl-Green, D. 2007. Diseases of amphibians. *ILAR Journal*, 48: 235–245.
- Felix, I.A. 2016. *Health assessment in Madagascar: invasive asian toad (Duttaphrynus melanostictus) as a vector for emerging pathogens*. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade de Lisboa). Lisboa. Portugal.
- Fratzke, A., Howard, L.L., Tociłowski, M.E., Armien, A., Oliveira, F., Ritchie, B. & Snook, E. 2019. *Chlamydia pneumoniae*, polyencephalomyelitis and ganglionitis in captive Houston toads (*Anaxyrus houstonensis*). *Veterinary Pathology*, 56: 789–793.
- Martel, A., Adriaenssen, C., Bogaerts, S., Ducatelle, R., Favoreel, H., Crameri, S., Hyatt, A.D., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2012. Novel Chlamydiaceae disease in captive salamanders. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 1020–1021.
- Martínez-Silvestre, A. 2019. Les maladies émergentes détectées chez les amphibiens dans les provinces des Pyrénées et des régions pré-pyrénéennes. *Congres de la Societe Herpetologique Francaise*, 47: 6–7.
- Pantchev, A., Bauerfeind, R., Sachse, K., Tycza, J. & Sting R. 2006. Chlamydiosis-but who is the real offender? Detection of chlamydiae in domestic animals using species-specific real-time PCR assays. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Annual Workshop of COST Action 855 “Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications”. Edinburgh. UK.
- Pessier, A. 2007. Cytologic diagnosis of disease in amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10: 187–206.
- Taylor, S., Green, E., Wright, K.M. & Wytaker, B.R. 2001. Bacterial Diseases. 159–179. In: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.), *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar, Kreger. Florida. USA.