

Infeción por dermocistidios en *Lissotriton helveticus* en Cataluña: nuevos datos y apuntes sobre su diagnóstico

Albert Martínez-Silvestre¹, Daniel Fernandez-Guiberteau², Laia Pérez-Sorribes² & Roser Velarde³

¹ CRARC (Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña). 08783 Masquefa. Barcelona. España. C.e.: crarc-masquefa@outlook.com

² GRENP (Grup de Recerca de l'Escola de la Natura de Parets del Vallès). Aj. Parets del Vallès, 08150. Parets del Vallès.

³ Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge. Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària. UAB. España.

Fecha de aceptación: 11 de diciembre de 2017.

Key words: Dermocystida, *Lissotriton helveticus*, Cataluña, diagnóstico.

Las infecciones causadas por protozoos o metazoos parásitos afectan a anfibios de todo el mundo; sin embargo, siguen siendo enfermedades poco estudiadas (Duffus y Cunningham, 2010). Además, desde inicios de 1900, parásitos protistas de la clase Mesomycetozoa han sido documentados en anuros y urodelos europeos y tan solo recientemente están siendo caracterizados e identificados a nivel específico (Pascolini, 2003; Fiegna *et al.*, 2017). En la vertiente norte del Pirineo se ha descrito en Ariège (Francia) (Courtois *et al.*, 2013). Su presencia en la península ibérica no ha estado citada hasta muy recientemente, concretamente en Galicia (Galán & Dopereiro, 2017) y Cantabria (Diego-Rasilla, 2017) aunque en estos casos la enfermedad solo se identificó por su aspecto morfológico externo y sin realización de análisis clínicos. La presente nota aporta nuevos datos sobre su detección en una población de *Lissotriton helveticus* en la vertiente sur del Pirineo (Cataluña) detallando su diagnóstico macroscópico e histológico.

El día 28 de junio de 2017 se realizó un muestreo que trascurrió entre las 19:00 y las 20:30. La finalidad de éste era el estudio de las poblaciones de *Lissotriton helveticus*, enmarcado dentro del proyecto de conservación de la especie en Cataluña y de las poblaciones de *Calotriton asper* para el proyecto interregional ECTOPYR. El trabajo se desarrolló

en la comarca de la Garrotxa (Cataluña), localizada en la cuadrícula UTM 10 x 10 km, 31T DG65 y su objetivo era la recogida de muestras biométricas y genéticas de las dos especies, así como datos de su biología.

Esta población habita en un arroyo de poca corriente con fondo rocoso, el cual va haciendo pequeños remansos donde en su fondo se encuentran abundantes piedras que sirven de refugio para los anfibios. El arroyo discurre por un bosque de galería donde la vegetación predominante es el avellano (*Coryllus avellana*) y el arce de Montpelier (*Acer monspessulanum*).

Esta localidad es de alto valor ya que alberga cuatro especies de urodelos en simpatria. Además, una de ellas –*Calotriton asper*– está en su límite altitudinal, siendo esta población una de las más bajas registradas en Cataluña (370 msnm). Durante este muestreo se localizaron cuatro ejemplares de *Calotriton asper*, uno de *Triturus marmoratus*, 24 de *Lissotriton helveticus*, tres de *Alytes obstetricans*, cinco de *Bufo spinosus* y 15 larvas de *Salamandra salamandra*.

Durante el reconocimiento de los ejemplares de *Lissotriton helveticus*, una hembra de gran tamaño destacó al presentar unos bultos en la zona gular y en el abdomen. Este animal fue retirado a un contenedor de transporte para posteriormente hacer un estudio detallado sanitario de las lesiones. Los 23 ejemplares

restantes fueron devueltos en el mismo lugar de sus capturas. Desafortunadamente, el animal con lesiones murió a los pocos minutos de su captura y fue conservado en etanol puro hasta la realización del examen *postmortem*.

Una vez terminado el muestreo y ante el riesgo de dispersión de enfermedades entre poblaciones, como medida de bioseguridad se procedió a la desinfección del material utilizado, botes y redes manuales y no se visitó ninguna otra población.

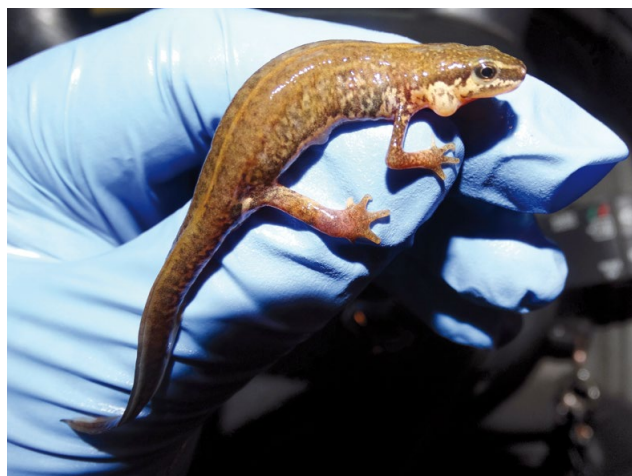
Llegado al laboratorio, al tritón afectado se le realizó una necropsia sistemática en la que se evidenció el estado reproductivo activo del ejemplar. Las lesiones más destacables fueron las cutáneas. En la piel se observaron vesículas/elevaciones de tamaño variable (entre 3mm y 4,5mm de diámetro) en la zona gular, nugal, costal derecha y lateral derecha de la cola. Estos pequeños bultos eran sésiles y de tacto deformable, aunque tensos, como conteniendo un líquido interior (Figura 1). En el ovario, los folículos estaban activos y con presencia de vitelo en distintos estadios. Para el estudio histológico, los tejidos seleccionados (piel lateral, piel de la cola, piel del área gular, cráneo, digestivo y ovario) se fijaron en formaldehído tamponado al 4% y procesados de forma rutinaria para ser seccionados y teñidos posteriormente mediante la tinción de

Hematoxilina/Eosina. El cráneo fue sometido previamente a un proceso de decalcificación. Además se guardó una extremidad anterior para un estudio osteocronológico que permitió adjudicar al animal una edad de 6 años.

Microscópicamente, en la sección transversal gular se observó en la dermis la presencia de una estructura esférica irregular de unos 1.500µm de diámetro con una fina cápsula eosinofílica. En su interior se observaron estructuras compatibles con endosporas en desarrollo. La estructura estaba rodeada de células inflamatorias, con predominio de macrófagos y un menor número de heterófilos/esosinófilos (Figura 2). En el citoplasma de los macrófagos se observó material fagocitado compatible con el contenido eosinofílico de las endosporas. Más profundamente y haciendo protusión en la mucosa orofaríngea se observó una concentración de células inflamatorias que sugerían la presencia de un segundo quiste a este nivel, donde los macrófagos contenían un material similar fagocitado.

Dentro de la clase Mesomycetozoa, se describe el orden de los dermocistidios. Existen especies de dermocistidios que infectan a mamíferos, aves, peces y anfibios. Una especie del grupo, *Amphibiocystidium ranae*, ha sido asociada con el declive de anfibios del género *Pelophylax*, *Rana* y *Lissotriton* en Italia (Duffus

Figura 1: Aspecto macroscópico del tritón afectado por *Dermocystidium*. Obsérvense las vesículas prominentes en los costados.



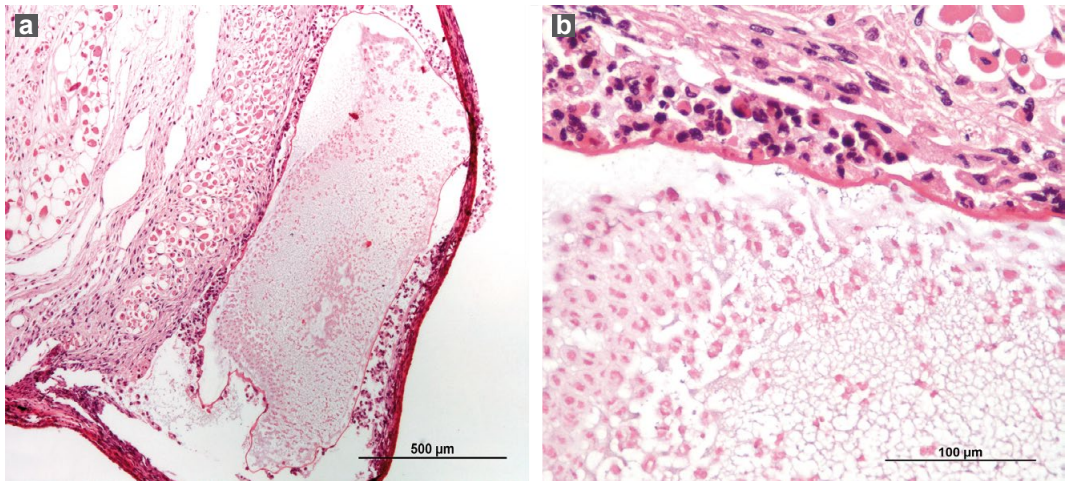


Figura 2: Imagen al microscopio de la piel de un ejemplar de *Lissotriton helveticus* afectado por un dermocistidio. a) Quiste intradérmico delimitado por una fina cápsula eosinofílica y rodeado de células inflamatorias. b) Detalle de las endosporas presentes en el quiste y del infiltrado inflamatorio que lo rodea.

& Cunningham, 2010). Sin embargo, la distribución real de estos parásitos es desconocida, lo cual subraya la necesidad de aportar datos de estas nuevas detecciones en anfibios salvajes y su impacto sobre las especies afectadas.

Si bien los dermocistidios se han clasificado como hongos en algunos trabajos (Galán, 2017), estos forman una rama de la clase Mesomycetozoa, un tipo de protozoos a menudo mencionado como ancestro de los metazoos. Mientras la verdadera relación entre hongos, animales y mesomycetozoa permanece poco clara, parece que estos, junto con los coanoflagelados, se sitúan en la frontera entre los animales y los verdaderos hongos (González-Hernández *et al.*, 2010).

La lesión macroscópica asociada a la infección con estos organismos consiste en tres estadios según la descripción publicada por González *et al.* (2010): vesícula, vesícula preulcerativa y úlcera. A veces se pueden detectar cúmulos de múltiples vesículas preulcerativas (González-Hernández *et al.*, 2010). En nuestro caso se detectó una vesícula en la comisura bucal y en la orofaringe, dato que

contrasta con la ausencia de vesículas en esa posición en los casos descritos por González-Hernández *et al.* (2010), y concuerda con la distribución sistémica descrita por Statt & Gaston (2014). Así, la lesión histológica observada en este animal es compatible con los parásitos descritos en la literatura como dermocistidios (Pereira *et al.*, 2005).

La microbiología y técnicas moleculares nos permiten valorar la existencia de coinfecciones con bacterias, hongos o virus que puedan coincidir en el mismo individuo. Si bien se han descrito áreas donde coinciden los hongos con dermocistidios (Courtois *et al.*, 2013), hasta el momento no se han registrado individuos en los que infecciones con dermocistidios y estas otras enfermedades coincidan. Los análisis realizados en la población de tritones en la que se aisló el caso de la presente nota fueron negativos a *Batrachochytridium dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* y *Ranavirus*.

El análisis molecular de los animales afectados permitirá clasificar e identificar el agente patógeno. Posteriores estudios en el ejem-

plar de esta nota permitirán identificar con precisión la especie implicada en este caso.

Se ha reportado que los parásitos dermocistidios pueden representar una amenaza a la supervivencia de poblaciones de anfibios salvajes que ya estén estresados o amenazados por otros factores ambientales (González-Hernández *et al.*, 2010). En casos de coinfección de varios patógenos es difícil elucidar cuál de los agentes ha sido el causante de la mortalidad. Al respecto, los patógenos de los anfibios más estudiados hasta el momento son los *Ranavirus* y los hongos del género *Batrachochytrium*. Sin embargo, no son los únicos patógenos que representan una amenaza para las poblaciones salvajes. En el caso aquí presentado, el buen estado reproductor del individuo, siendo negativo a las otras enfermedades emergentes, parece indicar que la muerte podría deberse al estrés generado por la captura, si bien esta causa de muerte es anecdótica en urodelos. En consecuencia, la presencia de quistes dermocistidios internos y externos podrían ser factores que debilitan al animal afectado pre-disponiéndolo al fatal desenlace.

La presente nota alerta sobre estos nuevos agentes patógenos que deben ser tenidos en consideración en el árbol diagnóstico de las enfermedades emergentes que pueden afectar a los anfibios ibéricos salvajes. Las recientes citas en la península ibérica de parásitos dermocistidios muestran que es una enfermedad a monitorizar para ver si se trata de una infección o enfermedad emergente, si aumenta su incidencia o su distribución por Europa y confirman la necesidad de posteriores investigaciones para conocer su prevalencia y patogenicidad.

AGRADECIMIENTOS: A E. Madrenys (PIRENALLIA), J. Soler, I. Verdaguer y A. Melero (CRARC), por su soporte en el trabajo de campo y laboratorio. A la Escola de la Natura de Parets del Vallès, al Ayuntamiento de Parets del Vallès, y al Ayuntamiento de Masquefà por su apoyo logístico. A N. Oromi (Universitat de Lleida) por el estudio osteocronológico del ejemplar. A E. Bassols (Parc Natural de la Zona Volcànica de la Garrotxa) por los permisos de captura y muestreo de los animales. A la Generalitat de Catalunya por la confianza depositada en las entidades firmantes del trabajo. Este estudio se ha realizado gracias a los fondos del proyecto europeo INTERREG POCTEFA ECTOPYR (2016-2019).

REFERENCIAS

- Courtois, E.A., Cornuau, J.H., Loyau, A. & Schmeller, D.S. 2013. Distribution of *Amphibiocystidium* sp. in palmate newts (*Lissotriton helveticus*) in Ariège, France. *Herpetology Notes*, 6: 539-543.
- Diego-Rasilla, F.J. 2017. Parasitic dermic cyst in *Mesotriton alpestris* (Caudata: Salamandridae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(2): 56-57
- Duffus, A.L.J. & Cunningham, A.A. 2010. Major disease threats to European amphibians. *The Herpetological Journal*, 20: 117-127.
- Fiegna, C., Clarke, C.L., Shaw, D.J., Baily, J., Clare, F.C., Gray, A., Garner, T.J. & Meredith, A.L. 2017. Pathological and Phylogenetic characterisation of *Amphibiothecum* sp. infection in an isolated amphibian (*Lissotriton helveticus*) population on the island of Rum (Scotland). *Parasitology*, 144(4): 484-496.
- Galán, P. & Dopereiro, D. 2017. Infección por dermocistidios (*Dermocystida*) en una población de *Lissotriton helveticus* de A Limia (Ourense, Galicia). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(1): 16-20.
- González-Hernández, M., Denoel, M., Duffus, A.L.J., Garner, T.W., Cunningham, A.A. & Acheson, K.A. 2010. Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59: 344-350.
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A.A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., Fagotti, A. & Di Rosa, I. 2003. Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium* n. gen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56: 65-74.
- Pereira, C.N., Di Rosa, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Pascolini, R. & Mendoza, L. 2005. The pathogen of frogs *Amphibiocystidium ranae* is a member of the order dermocystidain the class mesomycetozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1): 192-8.
- Stark, T. & Gaston, D.G. 2014. *Amphibiocystidium* infections in the Netherlands. *Tijdschrift*, 36: 54-57.