

Bioseguridad en trabajos de campo con reptiles y anfibios

Albert Martínez-Silvestre¹, Eva Graciá², Andrés Giménez², Vanessa Cadenas³,
María I. García de la Fuente², Barbora Thumsová^{4,5} & Jaime Bosch⁶

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

² Área de Ecología, Dpto. de Biología Aplicada. Universidad Miguel Hernández. 03202 Elche. Alicante. España.

³ Sección de Biodiversidad y Medio Natural. Departamento de Acción Climática, Ali-mentación y Agenda Rural. Generalitat de Catalunya. 43004 Tarragona. España.

⁴ Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Cl. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

⁵ Asociación Herpetológica Española (AHE). Cl. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

⁶ Instituto Mixto de Investigación en Biodiversidad (IMIB), CSIC-Universidad de Oviedo-Principado de Asturias. 33600 Mieres. Asturias. España.

Fecha de aceptación: 20 de septiembre de 2023.

Key words: Biosecurity, disinfection, emerging diseases, field work.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la aparición de brotes de enfermedades emergentes de anfibios y reptiles, así como la introducción de especies exóticas (de vertebrados e invertebrados) fuera de su área de distribución están cobrando especial relevancia. Además, en biología de la conservación se considera especie invasora aquella especie foránea que representa un perjuicio para las especies nativas o los humanos. De este modo, si una especie foránea es capaz de transmitir un patógeno a una especie nativa, ya podría pasar a considerarse invasora. Todo ello afecta en gran modo a los planes de conservación de especies (caso del brote del virus *Ranavirus* en anfibios de Ordesa (Aragón) (Bosch *et al.*, 2020), o del virus *Picornavirus* en tortugas terrestres en L'Albera (Girona) (Martínez-Silvestre *et al.*, 2021). Esto ha hecho que sea necesario extremar las precauciones de bioseguridad en los trabajos de campo con estos grupos animales. Los anfibios parecen elementos muy delicados en nuestros ecosistemas que sufren especialmente estos patógenos. Sin embargo, las enfermedades emergentes y sus potenciales vectores de transmisión no son exclusividad de los anfibios, sino que son una preocupación global para todos los ór-

denes animales. A modo de ejemplo, se han descrito en mamíferos (p.e. el hongo *Pseudogymnoascus destructans* en murciélagos -Gargas *et al.*, 2009-), peces (p.e. el virus *Novirhabdovirus* de los salmónidos -Kim & Faisal, 2011-), invertebrados (p.e. el hongo *Aphanomyces astaci* en los cangrejos europeos -Svoboda *et al.*, 2017-), o reptiles (p.e. la bacteria *Mycoplasma testudinis* en tortugas -Adamovicz *et al.*, 2020-, o el hongo *Ophidiomyces ophidicola* en serpientes -Lorch *et al.*, 2015-). Existen además patógenos normalmente asociados a la cautividad que se han empezado a ver provocando enfermedades en vida silvestre, como *Chlamydia* en anfibios, o *Cryptosporidium* en serpientes. También se han descrito infecciones cruzadas, como las que se producen entre cangrejos y anfibios (*Ranavirus*; Thumsová *et al.*, 2023), tortugas y anfibios (*Ranavirus*; Borzym *et al.*, 2020), coinfecciones en un mismo individuo (*Batrachochytrium salamandrivorans* y *Batrachochytrium dendrobatidis* -Ribas *et al.*, 2022-), etc. En consecuencia, y considerando que la mitigación de los patógenos en el campo es muy difícil y en muchos casos prácticamente imposible, deberíamos extremar los esfuerzos que se destinan a la prevención y bioseguridad de nuestro trabajo en el campo.

¿Qué enfermedades de anfibios nos preocupan?

Existen ya varias descripciones de patógenos emergentes provocando tumores, quistes parasitarios o pequeños brotes de mortalidad en poblaciones locales de anfibios de toda Europa. Aun así, de momento las enfermedades de mayor preocupación que deberemos tener en cuenta en anfibios españoles son las fúngicas causadas por los hongos *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd, ampliamente repartida en España y Portugal en anuros y urodelos) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal, introducida recientemente en España en urodelos salvajes), las víricas causadas por virus del género *Ranavirus* (provocando brotes de mortalidad en España desde los años 80, y en Portugal desde 2003) y las bacterianas, como las provocadas por el género *Chlamydia* (tan solo conocida por ahora en ejemplares cautivos en España pero ya detectada en anfibios libres en Suiza -Blumer *et al.*, 2007-).

¿Qué enfermedades de reptiles nos preocupan?

Los patógenos detectados en tortugas en España son *Herpesvirus*, *Mycoplasma* o bien *Picornavirus* (Martínez-Silvestre *et al.*, 2021). Existen otros que, si bien no se han descrito en libertad aún en la Península, están descritas en cautividad o en instalaciones al aire libre y podrían detectarse en animales salvajes si no se aplican las medidas adecuadas, como formas tuberculosas atípicas de *Mycobacterium* (Muro *et al.*, 2020). Otras enfermedades emergentes que se han descrito ya afectando a tortugas salvajes en otros países y ante las cuales debemos extremar la precaución son la ranaviriosis, la coccidiosis intranuclear, la cryptosporidiosis y la micosis por *Emydomyces testivorans* (Adamovicz *et al.*, 2020). En tortugas marinas se han descrito virus del papiloma en adultos (Manire *et al.*, 2008), e incluso la transmisión de

hongos *Fusarium* durante la manipulación de huevos (Phillot & Parmenter, 2001). En serpientes la principal preocupación es la micosis causada por *Ophidiomyces ophidicola*. Si bien este hongo aún no se ha detectado en España, se ha descrito dos casos de mortalidad en *Vipera seoanei* salvaje por otro hongo del mismo grupo (*Parananniziopsis* sp.) (Blanvillain *et al.*, 2023). También en serpientes se han encontrado ejemplares de *Natrix maura* infectados con *Ranavirus* e incluso muertos durante brotes de enfermedad (Price *et al.*, 2014; Von Essen *et al.*, 2020). En saurios salvajes en España no se ha descrito por el momento ninguna enfermedad emergente, de las que destacamos las potencialmente provocadas por *Adenovirus*, *Ranavirus*, *Reovirus*, y las dermatopatías causadas por la bacteria *Devriesea agamarum* o el hongo *Nanniziopsis* sp. (Hellebuyck *et al.*, 2011). Tan solo hay un caso sospechoso de esta última enfermedad en un lagarto verdinegro salvaje de Álava que no pudo llegar a confirmarse (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022), así como un ejemplar de *Podarcis bocagei* infectado con *Ranavirus* (Von Essen *et al.*, 2020).

¿Qué entendemos por Bioseguridad?

El Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, fundada como Oficina Internacional de Epizootias, OIE) define bioseguridad como un conjunto de medidas físicas y de gestión diseñadas para reducir el riesgo de introducción, erradicación y propagación de las enfermedades, infecciones o infestaciones animales hacia, desde y dentro de una población animal (OMSA, 2022a, 2022b). Desde el punto de vista epidemiológico, de nada sirve manipular una rana o salamandra con guantes y ese mismo día manipular una tortuga o cangrejo sin guantes o reutilizando

los mismos. Así, unas mínimas medidas de higiene deberían aplicarse por todos los colectivos científicos o técnicos que manipulen cualquier especie salvaje. A diferencia de otros colectivos, como el ornitológico, el colectivo herpetológico (sea profesional o aficionado) suele realizar una mayor captura y manipulación de los ejemplares, elevando considerablemente el riesgo de transmisión antropogénica de enfermedades emergentes. El presente trabajo pretende dar a conocer las limitaciones legales y los criterios científicos que deben usarse para los trabajos de campo en herpetología, a fin de optimizar nuestras actuaciones en estos grupos animales y minimizar el impacto de nuestro paso por el ecosistema.

MARCO LEGISLATIVO

En general se asume que actualmente las actividades humanas están dispersando por el mundo más especies de herpetos de lo reconocido previamente, y que la mayoría de estos polizontes suelen saltarse las variadas jurisdicciones del mundo que carecen de programas integrales de bioseguridad (Chapple *et al.*, 2016). La Unión Europea y algunas organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), reconocen la importancia de la protección de la salud animal y proponen un enfoque integrado de la bioseguridad (FAO, 2007; OMSA, 2010). Por ese motivo, y a raíz de la pandemia de la Covid-19, a partir de octubre de 2022 se reforzó la acción internacional contra las amenazas sanitarias bajo el enfoque “Una salud”. De esta forma se pretende integrar la prevención, vigilancia, respuesta y gestión de las enfermedades,

poniendo especial énfasis en los animales silvestres, de manera que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten.

En España la Ley 8/2003, de aplicación en todo el territorio nacional, establece que deben aplicarse medidas de sanidad animal a laboratorios, mataderos, explotaciones ganaderas, vehículos de transporte, intercambios con otros países y fauna silvestre (BOE, 2003). Estas medidas son desarrolladas por normativa sectorial específica y documentos técnicos sobre bioseguridad para distintas especies, tanto a nivel estatal, como autonómico. Sin embargo, no existe ninguna directriz que aborde específicamente el manejo de reptiles y anfibios.

En los últimos años la bioseguridad se ha convertido en uno de los puntos prioritarios en materia sanitaria, lo que se ve reflejado en la incorporación de la misma como pilar fundamental dentro de las medidas que se postulan en la Ley de Sanidad Animal Europea (UE, 2016), de aplicación en todos los estados miembros desde el año 2021. El reglamento establece normas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles, incluyendo las consideradas emergentes (enfermedades de reciente preocupación por su elevada patogenicidad o creciente distribución geográfica) y las zoonosis (enfermedades transmisibles a los humanos). De esta manera, se ha consolidado un marco jurídico global con principios armonizados para todo el sector en materia de sanidad animal.

Debido al impacto en el medio natural y la creciente preocupación por las poblaciones de urodelos, la Comisión Europea encargó una evaluación científico-técnica a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria respecto al riesgo de transmisión de Bsal

(EFSA *et al.*, 2017a, b). A raíz de los datos obtenidos, se incorporó el Bsal como "enfermedad de categoría D y E" en la lista del citado reglamento (UE, 2016, 2018a). Por ese motivo, en los últimos años se han establecido diversas medidas zoonosanitarias de emergencia para seguir un programa de vigilancia y evitar su propagación -que incluyen aspectos higiénicos, de bioseguridad, cuarentenas, certificados zoonosanitarios, análisis y tratamientos- para los desplazamientos de partidas de salamandras (entendiéndose como tales todos los anfibios del orden Caudata) entre estados miembros y para su entrada en la Unión Europea (UE, 2018b, 2019, 2021).

Además de la notificación de brotes de Bsal (UE, 2020), se consideran enfermedades de declaración obligatoria la infección por Bd y por *Ranavirus*, según la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, 2022b). Además de los patógenos antes citados, únicamente el hongo Bd está incorporado en el Catálogo de especies exóticas invasoras, por lo que las administraciones competentes implementan medidas de prevención y de lucha (BOE, 2013).

BIOSEGURIDAD Y PREVENCIÓN DURANTE EL MANEJO DE HERPETOS SALVAJES

Persistencia en el medio

La persistencia en el medio de los agentes causantes de enfermedades emergentes es muy variable y, particularmente cuando se cumplen condiciones ambientales favorables, pueden persistir de medio a largo plazo. Por ejemplo, estudios de laboratorio han documentado la persistencia de zoosporas de Bd en agua esterilizada y arena húmeda entre 7 y 12 semanas (Johnson & Speare, 2003, 2005). En campo, la propagación y persistencia del hongo en los sustratos terrestres y la

vegetación ribereña se ha estimado en varias semanas (Kolby *et al.*, 2015). Por otro lado, la estrategia de Bsal es ligeramente diferente ya que produce dos tipos de zoosporas: esporas con motilidad, que pueden nadar activamente, y esporas enquistadas infectantes que flotan en la interfaz agua-aire y pueden permanecer infectivas durante al menos 31 días en el agua filtrada del estanque. Además, se ha demostrado también la transmisión desde el suelo del bosque, en donde las zoosporas de Bsal han conseguido mantener su viabilidad hasta 48 horas después de que el suelo estuvo en contacto con un animal infectado (Stegen *et al.*, 2017). Por otro lado, los *Ranavirus* podrían tener una capacidad aún mayor de persistir en el medio natural y, por supuesto, en los cadáveres de animales infectados (Brunner *et al.*, 2015; Brunner & Yarber, 2018). Por ejemplo, se ha comprobado que pueden persistir a -20 y -70° C durante más de 2 años en tejidos de peces (Langdon, 1989), y que no pierden totalmente su capacidad infectiva tras más de 30 días únicamente en agua no tratada y mantenida a 20° C (Nazir *et al.*, 2012). También los *Ranavirus* tienen capacidad en ciertas condiciones de persistir en el medio natural. En consecuencia, la elección de un agente desinfectante deberá estar supeditada al tipo de actuación, hábitat donde se actuará y patógeno que se pretende prevenir. En la Tabla 1 se indican algunos ejemplos de persistencia para los principales patógenos emergentes de reptiles y anfibios. Cabe destacar que la mayoría de estudios de persistencia se han realizado en condiciones de laboratorio o in vitro. En condiciones naturales (ambientes con otros microorganismos competidores) la persistencia suele verse reducida (Campbell *et al.*, 2021).

Tabla 1: Persistencia de los principales patógenos emergentes de reptiles y anfibios, así como las condiciones en las que se ha probado y la fuente bibliográfica.

Grupo	Especie	Tiempo máximo de persistencia	Condiciones probadas	Bibliografía
Hongos	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	7 a 12 semanas	Agua esterilizada	Johnson & Speare, 2003, 2005
	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	31 días	Agua de estanque	Stegen <i>et al.</i> , 2017
	<i>Ophidiomyces ophidiicola</i>	Pocos días	Suelo estéril	Campbell <i>et al.</i> , 2021
Bacterias	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	12 a 30 horas	Papel y mármol	Falsey & Walsh, 1993
	<i>Devirosea agamarum</i>	5 meses	Arena húmeda / agua destilada	Latney & Wellehan, 2020
	<i>Mycoplasma</i>	24 – 30 horas	Biofilm	McAuliffe <i>et al.</i> , 2006
Virus	<i>Herpesvirus</i>	Pocas horas	Humedad	Blumental & Lepage, 2019
	<i>Picornavirus</i>	> de 3 semanas / Hasta meses	Temperaturas de verano / Invierno	Marschang, 2019
	<i>Ranavirus</i>	Meses / Años	Suelo y agua / Tejidos vivos	Brunner & Yarber, 2018

Zoonosis bidireccionales

Una de las bacterias que más afectan a los anfibios es *Chlamydia pneumoniae*, y en personas puede provocar desde enfermedad asintomática hasta síntomas de resfriado/gripe (tos, estornudos, algo de fiebre) e incluso neumonía en personas inmunodeprimidas. Cuando la persona está afectada es eliminadora de *Chlamydia* durante una a dos semanas aproximadamente. En la mayoría de los casos se cura sin tratamiento. Por lo tanto, si en un programa de cría en cautividad en anfibios no se incluye la prohibición de entrar en la sala a las personas que tengan síntomas respiratorios (aunque sean leves y no obliguen a pedir la baja laboral), estos podrían causar un brote. Este posible escenario no ocurre, sin embargo, con otros patógenos que no causan zoonosis, como son Bd, Bsal o *Ranavirus*.

Barreras físicas

Existe un estudio comparativo que demuestra que la piel de las manos del manipulador tiene un efecto fungicida frente a Bd, en comparación con el uso de guantes (Méndez *et*

al., 2008) eliminando el 100 % de las esporas tras 6 minutos de contacto (si bien esa capacidad se pierde tras la limpieza de manos mediante uso de etanol o gel hidroalcohólico). Sin embargo, siempre es recomendable el uso de guantes por varios motivos. En primer lugar el microbioma cutáneo del manipulador puede contener no solo a Bd sino a otros múltiples agentes potencialmente nocivos para el animal. Por otro lado, las manos del manipulador pueden contener restos de perfumes, gel hidroalcohólico (especialmente a raíz de las medidas tomadas por la pandemia de la



Figura 1: La coloración de los guantes no es un indicativo de su composición. Los recomendados guantes de nitrilo pueden tener distintas coloraciones según la marca comercial.



Figura 2: Manipulación en trabajo de campo de tortugas (*Testudo graeca*, arriba) y anfibios (*Calotriton asper*, abajo) con guantes de nitrilo.

Covid-19), loción antimosquitos, maquillajes, cremas hidratantes, restos de tabaco, cremas con filtro solar, entre otros, que podrían dañar la piel o las mucosas e incluso alterar la coloración reduciendo su efectividad como señal comportamental.

Guantes clínicos: Ante las distintas composiciones de este tipo de guantes (látex, vinilo, nitrilo), en el manejo de reptiles y anfibios adultos, así como sus larvas o huevos, se recomienda el uso de los guantes de nitrilo (Figuras 1, 2 y 3). Se ha demostrado que los guantes de nitrilo poseen una cierta actividad fungicida contra *Batrachochytrium* (Thomas *et al.*, 2020). En consecuencia, se debe tener en cuenta tres aspectos: a) considerando su actividad fungicida su uso durante el muestreo podría originar falsos negativos en anfibios con cargas muy bajas de este hongo. b) Por otro lado, al humedecer los guantes de nitrilo para manipular anfibios, éstos pierden eficacia antifúngica (Méndez *et al.*, 2008); y, finalmente, c) en larvas de anfibios se

ha descrito toxicidad referida al uso tanto de látex, vinilo, como nitrilo (Cashins *et al.*, 2008; Greer *et al.*, 2009).

Guantes de cuero: Debido al manejo de especies peligrosas, el uso de guantes de nitrilo se suele sustituir por guantes de cuero. El exterior de estos guantes puede desinfectarse mediante pulverización de *Virkon* 1%. Respecto al interior, recomendamos desinfectar las manos con derivados hidroalcohólicos antes de introducirlos en el guante. Si esa práctica se mantiene siempre, el interior del guante puede considerarse como una atmósfera desinfectada.

Productos, pautas y aplicaciones

Los tratamientos químicos a destacar son los enumerados en la Tabla 2. Cabe considerar que no existe el desinfectante perfecto que permite combatir a todos los agentes en todos los hábitats. Sirvan dos ejemplos: en primer lugar, la sal común (cloruro sódico) si bien se ha citado como tratamiento en enfermedades fún-



Figura 3: Manipulación con guantes de nitrilo durante una translocación de huevos de *Caretta caretta* en una playa de Tarragona.

Tabla 2: Agentes químicos usados en desinfección, con sus ventajas, inconvenientes y fuente bibliográfica consultada.

Producto Químico	Aplicaciones	Pros	Contras	Bibliografía
Ácido Peracético		<ul style="list-style-type: none"> · Accesible. · Letal para Bd. 	<ul style="list-style-type: none"> · No tóxico para invertebrados pero tóxico para anfibios. 	Lammens <i>et al.</i> , 2021
Amonio Cuaternario		<ul style="list-style-type: none"> · Económico. · Poco corrosivo. · Biodegradable. 	<ul style="list-style-type: none"> · Inactivado por jabones y residuos orgánicos. 	
Clorhexidina (0,05%–0,5%)			<ul style="list-style-type: none"> · Mínimo de 5 minutos de tiempo de contacto. 	Latney & Wellehan, 2020
Etanol 70%	Aconsejado sólo para instrumentos, herramientas y pequeño equipamiento sensible a la corrosión.	<ul style="list-style-type: none"> · Fácil disponibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> · Rápida evaporación (poco útil en patógenos que necesitan acción prolongada de desinfección). · Irritante cutáneo. 	Latney & Wellehan, 2020
Hipoclorito sódico (Lejía) (3 a 5,25%)	Efectivo contra cualquier agente biológico ya que destruye el ADN.	<ul style="list-style-type: none"> · Económico. · Fácil disponibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> · Solo útil a partir de concentraciones superiores al 3%. Algunos preparados comerciales son inferiores. · Se precisa sumergir completamente el material. Tiempos de aplicación elevados (superiores a 15 min. para una garantía total). · Las pastillas potabilizadoras son insuficientes. · Inactivo fácilmente en presencia de exceso de materia orgánica. · Produce toxicidad ambiental. · Corrosivo. · Irritante por contacto. 	Latney & Wellehan, 2020 Jourdan <i>et al.</i> , 2022
Sales de Sulfato-Sulfonato sulfámico (<i>Virkon S</i>)		<ul style="list-style-type: none"> · Poco corrosivo e irritante. · Biodegradable al cabo de 7 a 10 días. · Resistente a la inactivación. 	<ul style="list-style-type: none"> · Precio elevado. · Toxicidad en organismos acuáticos. · Tóxico por inhalación, especialmente al prepararlo. · Vida media corta una vez preparada la disolución. · Necesita tiempo de aplicación muy largo contra ciertos agentes como <i>Cryptosporidium</i>. · Poca efectividad frente a <i>Mycobacterium</i>. 	Ares-Mazás <i>et al.</i> , 1997 Broadley <i>et al.</i> , 1993

gicas por *Saprolegnia* (Rivera, 2022) las concentraciones y pautas que se describen (10–25 g/l en baño durante 5–30 minutos) son imposibles de mantener en el medio ambiente, de modo que no se considera que el uso de cloruro sódico sea un buen método a aplicar como

técnica de bioseguridad. Por otro lado, las tan utilizadas sales de sulfato / sulfonato (*Virkon S* 1%), pese a ser muy eficaces contra *Batrachochytrium* (Bosch *et al.*, 2015), y tener un buen efecto viricida, se han considerado desinfectantes de efecto menor contra hongos miceliares

Tabla 3: Métodos físicos usados en desinfección, indicando ventajas e inconvenientes.

Método físico	Aplicaciones	Pros	Contras
Calor	Efectivo contra la mayoría de patógenos si se utilizan temperaturas elevadas y tiempos de exposición elevados. Lavadora (lavado superior a 40° C). Secadora, Microondas, Autoclave, Pupinel.	Lavado de ropas, calzados y recipientes, sustratos y decorados.	Riesgo de dañar equipos electrónicos. En el caso de <i>Ranavirus</i> las temperaturas tienen que ser cercanas a 100° C.
Deshidratación		Efectivo contra muchos microorganismos como Bd.	Bajo coste. No efectivo contra esporas de resistencia. No útil contra Bsal o <i>Ranavirus</i> .
Ozono	Común en sistemas de desinfección de acuarios.	Efectivo contra muchos microorganismos acuáticos.	Difícil de conseguir. Coste elevado.
Ultravioleta	Efectivo contra mayoría de patógenos.	Desinfección de equipos electrónicos.	Es necesario exponer a la radiación todas las superficies girando el material en sesiones de 20 a 30 minutos. Puede resultar caro.

patógenos (Hernández *et al.*, 2000). Ello, unido a la dificultad en la eliminación de la bacteria *Mycobacterium* o el protozoo parásito *Cryptosporidium* (patógenos también comunes en reptiles y anfibios -Vemulapaly *et al.* 2021; Broadley *et al.*, 1993-), convierten al *Virkon S* en un agente desinfectante de nivel regular.

En el caso de los aparatos electrónicos se recomienda el uso de alcohol por su rápida evaporación, para no dañar los circuitos electrónicos. Las cámaras y los teléfonos móviles acumulan gran cantidad de suciedad durante su uso en los trabajos de campo y su constante utilización sin efectuar limpiezas adecuadas supone un riesgo para la bioseguridad. Convenientemente, existen esterilizadores de pequeño tamaño, que actúan mediante métodos no químicos (por radiación ultravioleta del tipo B/C) ideados para su uso en esterilización de material clínico, de farmacia o peluquería, e incluso para teléfonos móviles, que pueden usarse para pequeño equipamiento como baterías, teléfonos móviles, ordenadores portátiles, relo-

jes o cámaras. El tiempo estimado de esterilización de un teléfono móvil es de 15 minutos aproximadamente, mientras no se abra la tapa del esterilizador (Tabla 3; Figura 4). El calor, la deshidratación o el ozono pueden ser técnicas físicas utilizables, si bien no afectan por igual a todos los agentes microbianos (Tabla 3).

Protocolo de bioseguridad para el manejo de herpetos

Seguidamente se enumeran los puntos generales básicos para el manejo de herpetos en estudios de campo o gestión de poblaciones.

Poblaciones *in situ*

- 1) Usar guantes desechables nuevos, al menos, para cada localidad (y aplicar etanol 70% entre distintos ejemplares si no se cambian).
- 2) Si es preciso retener temporalmente algún ejemplar, utilizar solo material nuevo y desechable, como bolsas de plástico de un solo uso (el uso de contenedores de plástico duro está desaconsejado por el alto riesgo de transmisión de patógenos en caso de

Foto Albert Martínez-Silvestre



Figura 4: Aparato comercial emisor de radiación ultravioleta para desinfección de utensilios. Cuando está en funcionamiento (abajo) emite una coloración azulada característica.

una desinfección defectuosa). Para evitar el riesgo de sofocación/deshidratación en herpetos de pequeño tamaño mantenidos largo tiempo en bolsas, una alternativa puede ser el uso de bolsas de red susceptibles de esterilización en autoclave.

- 3) Guardar todo el material desechable utilizado en una bolsa de plástico cerrada añadiendo *Virkon S* en su interior.
- 4) Limpiar el material. Eliminar el máximo de materia orgánica, barro, algas, para optimizar los tiempos y efectos de la posterior desinfección. Para ello evitar utilizar cepillos, etc. que puedan actuar como fómites o reservorios accidentales de los patógenos. En caso de usar cepillos, asegurar que sean de cerdas duras y que se guardan limpios junto con las botas según el paso 3.
- 5) Desinfectar el material que haya entrado en contacto con el medio y con los animales antes de abandonar cada localidad de

estudio (Figura 5). En vista de las distintas efectividades y, a fin de combatir el máximo número de patógenos posibles y no sólo algunos (Bd, o Rv, por ejemplo), los autores recomendamos la combinación de *Virkon S* 1% (solución comercial) e hipoclorito sódico (lejía) al 3%, a razón de una parte de solución comercial con 32 de agua (ver cuadro adjunto). Respecto al hipoclorito sódico cabe considerar los siguientes aspectos:

- a) La concentración al 0,2% mantenida más de 10 minutos es eficaz frente a Bd (Johnson *et al.*, 2003), pero no frente a Bsal o *Ranavirus*.
- b) La concentración de 1,6% en baños de más de 5 minutos es eficaz frente a Bsal y Bd (Bsal Europe, 2022), pero no frente a *Ranavirus*.
- c) La concentración de 3% durante un mínimo de 1 minuto es eficaz frente a Bsal, Bd y *Ranavirus* (Phillot *et al.*, 2010).

PROTOCOLO DE DESINFECCION EN 3 PASOS

1. En casa (de horas a días antes de realizar el trabajo de campo):
Dilución 1/32 de hipoclorito sódico comercial. O sea: 125 ml de Lejía en 4 l de agua (una “tazita de café” con lejía en una garrafa de 4 l de agua). Dejar actuar mínimo de 10 minutos todo el material que se ponga en contacto con el medio acuático. Enjuagar y dejar secar.
2. Una vez realizado el trabajo de campo (y después de limpiar minuciosamente de barro y restos de material):
VIRKON. Pulverizar los materiales utilizados. Incluir salabres, botas, cepillos, etc. en una bolsa cerrada y dejar actuar durante un mínimo de 10 minutos.
3. A pesar de usar un equipo por zona, siempre que sea posible es necesario repetir el paso 1 al llegar a casa.



Figura 5: Desinfección de las suelas tras retirar el máximo de barro y restos vegetales del calzado al finalizar el trabajo de campo con tortugas de tierra.

d) La concentración de 3% y superiores durante un mínimo de 1 minuto es efectiva contra el hongo de las serpientes (*Ophiidiomyces*) (Gray *et al.*, 2017).

- 6) En el caso de botas o mangas se pueden pulverizar completamente con *Virkon S* (Figura 6) o introducirlas en una bolsa de plástico cerrada para crear una atmósfera protectora. Varias horas después se aconseja sumergir el material en hipoclorito sódico al 3% durante 10 a 15 minutos y enjuagar después.
- 7) Restringir las tareas de trabajo de campo a un equipo de personas determinado, sin que haya movimiento entre zonas. Es decir, una zona = un equipo, ya que los protocolos de trabajo tampoco garantizan la completa y perfecta esterilización debido a la complejidad de su aplicación. Evitar

que un equipo que trabaje en una zona de conocida mortalidad masiva por un patógeno emergente sea el mismo que trabaje en la gestión de una especie amenazada.

- 8) Utilizar diferente material de campo previamente desinfectado totalmente si se visita una nueva localidad situada a más de 2km (en línea recta) de la anterior (para localidades cercanas, es posible, aunque no aconsejable, reutilizar el material pulverizando nuevamente con *Virkon S* y aclarándolo con agua antes de usarlo de nuevo).
- 9) Completar la desinfección del material no desechable usado en el campo al llegar a casa o al laboratorio según se describe en el cuadro adjunto. Evitar la desinfección justo antes de empezar el trabajo para evitar introducir concentraciones tóxicas de los desinfectantes en el medio.

Poblaciones *ex situ* y liberaciones

Independientemente de contar con los permisos necesarios en los trabajos de campo, el riesgo de introducir enfermedades en el medio es altísimo. Ni tan sólo descartando unas enfermedades hoy conocidas podemos asegurar que los animales no son portadores de las enfermedades que se describirán mañana. Así, en general, nunca se deben poner en contacto herpetos cautivos con herpetos salvajes o con el medio donde habiten. Las introducciones en el medio de animales procedentes de cautividad únicamente se justifican con objetivos de conservación de las poblaciones silvestres (ej. programas de cría en cautividad) y, en consecuencia, especialmente tendrán que garantizar las cuestiones relativas a la bioseguridad. Además, se desaconseja mantener poblaciones *ex situ* en zoológicos y otras instalaciones con un gran número de animales de procedencias variadas. Las instalaciones *ex situ* deberían es-

tar, preferentemente, dentro del área de distribución de la especie en cuestión, sin que exista movimiento de animales de fuera de esa área.

Para el manejo de anfibios en esas instalaciones (ej. centros de cría en cautividad, centros de recuperación de especies, centros de investigación, etc.) se tendrá que someter a los nuevos ejemplares a una cuarentena estricta durante al menos 1 mes (según se extrae de la Tabla 2). Durante ese período, los anfibios recién llegados deben ser analizados, como mínimo, para Bsal, Bd y *Ranavirus*. En el caso de reptiles se alargará la cuarentena a un par de meses y se sugiere analizar para otros patógenos emergentes detectados en la zona o especie de estudio (*Mycoplasma*, *Ranavirus*, *Herpesvirus* y *Picornavirus* en tortugas, por ejemplo). Si el resultado es positivo, los ejemplares deben ser tratados o eliminados del grupo. Durante este período de cuarentena, todos los materiales y el contenido de los terrarios deben desinfectarse completamente antes de ser desechados o reutilizados. El agua usada, y

cualquier contenido de los terrarios que pudiera estar contaminado por haber estado en contacto con los animales, también deben ser desinfectados antes de ser desechados o reutilizados. Un tratamiento térmico es el método más recomendable ya que es fácil de aplicar y no produce contaminación ambiental. Para ello, todos los residuos y materiales deben ser tratados como mínimo durante 30 minutos a, al menos, 60° C.

¿Qué hacer con los animales muertos de un brote?

Una vez se detecta un brote de mortalidad en la naturaleza, surge la duda de qué hacer con los ejemplares muertos en distintos grados de descomposición y qué normas de bioseguridad deberían seguirse. Ante todo debe tenerse en cuenta que no deben ser movidos o cambiados de sitio por nadie a fin de no ayudar a la dispersión del agente infeccioso que ha ocasionado el brote. El traslado de ejemplares sólo puede realizarse por personal

Foto Jaime Bosch



Figura 6: Pulverización a fondo de botas y vadeadores usados después de un trabajo de campo con anfibios.

con el permiso específico de la administración competente. Los animales deberán ser depositados en contenedores estancos y debidamente desinfectados con los desinfectantes comentados en la Tabla 2. Este contenedor será eliminado junto con los animales en su interior mediante incineración. Si se traslada un animal para su análisis deberá ser introducido en alcohol *in situ*, para evitar la dispersión del posible patógeno durante el trayecto.

Enterrar los animales puede ser contraproducente, ya que las condiciones del suelo (humedad, oscuridad) pueden favorecer que los patógenos se mantengan largo tiempo activos. Se recomienda, pues, no manipular indebidamente los cadáveres y notificar el hallazgo a la administración competente para que adopte las medidas necesarias y particulares para cada caso.

AGRADECIMIENTOS: A J. Soler y Z. Alonso (CRARC, Masquefa), E. Obón y F. Carbonell (Centre de Recuperació de Torreferrussa, Generalitat de Catalunya, Código MBCFS -06-23), S. Giralt, L. Garrido (Fundación CRAM), E. Abella (Universitat de Vic) y especialmente a E. Pujol-Buxó, A. García-Salmerón, F. Loras-Ortí, E. Filella, J. Maluquer, O. Baena y J. Roca (SCH- Societat Catalana de Herpetologia); A. Montori y D. Fernández-Guibertau (CREAC-GREN; Calafell), M. Chaoui Elbrehmati y A. Tórtola (*Biocyma SL*), M. Puig Ribas, I. Marco, O. Cabezón y J. Espunyes (Facultad de Veterinaria; UAB-Universidad Autónoma de Barcelona), D. Pons, E. Valbuena, D. Guinard y los guardas de parques de la Diputación de Barcelona, así como a F. Oficialdegui, por todos los consejos y experiencias compartidos. A M.Á. Carretero por su revisión crítica y enriquecedora del manuscrito. Esta publicación es parte del proyecto TED2021-130381B-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea "NextGenerationEU"/PRTR.

REFERENCIAS

- Adamovicz, L., Allender, M.C. & Gibbons, P.M. 2020. Emerging infectious diseases of chelonians. An Update. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animals*, 23: 263–283.
- Ares-Mazás, E., Lorenzo, M.J., Casal, J.A., Fernández da Ponte, B., Castro, J.A. & Freire, F. 1997. Effect of a commercial disinfectant ('Virkon') on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Hosp Infection*, 36(2): 141–145.
- Blanvillain, G., Martínez-Freiria, F., Lorch, J.M., Hoyt, J.R. & Martínez-Silvestre, A. 2023. Analysis of emerging pathogenic fungi in snakes from the Iberian Peninsula. *Spanish Congress of Herpetology*, XXI: 83–84.
- Blumental, S. & Lepage, L. Management of varicella in neonates and infants. 2019. *BMJ Paediatrics Open*, 3(1): e000433. <doi.org/10.1136/bmjpo-2019-000433>
- 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.
- BOE. 2003. Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal. *Boletín Oficial del Estado*. «BOE» núm. 99, de 25/04/2003.
- BOE. 2013. Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras. *Boletín Oficial del Estado*. «BOE» núm. 185, de 03/08/2013.
- Borzym, E., Stachnik, M., Reichert, M., Rzezutka, A., Jasik, A., Waltzek, T.B. & Subramaniam, K. 2020. Genome sequence of a *Ranavirus* isolated from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Poland. *Microbiology Resource Announcements*, 9(47):e00781-20.
- Bosch, J., Sanchez-Tomé, E., Fernández-Loras, A., Oliver, J.A., Fisher, M.C. & Garner, T.W. 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters*, 11(11): 20150874.
- Bosch, J., Thumsová, B., Velarde, R. & Martínez-Silvestre, A. 2020. Diferente susceptibilidad de *Rana pyrenaica* a dos enfermedades emergentes de anfibios. *Jornadas de Investigación Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido*, VI: 51–57.
- Broadley, S.J., Furr, J.R., Jenkins, P.A. & Russell, A.D. 1993. Antimycobacterial activity of 'Virkon'. *Journal of Hospital Infection*, 23(3): 189–97.
- Brunner, J.L. & Yarber, C.M. 2018. Evaluating the importance of environmental persistence for *Ranavirus* transmission & epidemiology. *Advances in Virus Research*, 101: 129–148.
- Brunner, J.L., Storfer, A., Gray, M.J. & Hoverman, J.T. 2015. *Ranavirus* ecology and evolution: from epidemiology to extinction. 71–104. In: Gray, M.J. & Chinchir, V.G. (eds.). *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. Springer International Publishing, Berlin, Germany.
- Bsal Europe. 2022. Mitigation Measures. <http://bsaleurope.com/>. [Consulta: 3 julio 2023].
- Campbell, L.J., Burger, J., Zappalorti, R.T., Bunnell, J.F., Winzeler, M.E., Taylor, D.R. & Lorch, J.M. 2021. Soil reservoir dynamics of *Ophidiomyces ophidiicola*, the causative agent of snake fungal disease. *Journal of Fungi*, 7(6): 461.
- Cashins, S.D., Alford, R.A. & Skerratt, L.F. 2008. Lethal effect

- of latex, nitrile and vinyl gloves on tadpoles. *Herpetological Review*, 39(3): 298–301.
- Chapple, D.G., Kneegtmans, J., Kikillus, H. & van Winkel, D. 2016. Biosecurity of ex-otic reptiles and amphibians in New Zealand: building upon Tony Whitaker's legacy. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 40: 66–84.
- EFSA (European Food Safety Authority), Baláz, V., Gortázar Schmidt, C., Murray, K., Carneseccchi, E., García, A., Gervelmeyer, A., Martino, L., Muñoz Guajardo, I., Verdonck, F., Zancanaro, G. & Fabris, C. 2017a. *Scientific report: scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal) in the EU*. EFSA Journal 2017;15(2):4739.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), More, S., Bötner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Gortazar, C., Michel, V., Miranda, M.A., Nielsen, S.S., Raj, M., Sihvonen, L., Spooler, H., Stegeman, J.A., Thulke, H.H., Velarde, A., Willeberg, P., Winckler, C., Baldinelli, F., Broglia, A., Candiani, D., Fabris, C., Georgiadis, M., Zancanaro, G., Beltran-Beck, B., Kohnle, L. & Bicot, D. 2017b. *Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429: Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*. EFSA Journal 2017;15(11): 5071.
- Falsey, A.R. & Walsh, E.E. 1993. Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 168(2): 493–496.
- FAO. 2007. Instrumentos de la FAO sobre la bioseguridad. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.
- Gargas, A., Trest, M.T., Christensen, M., Volk, T.J. & Blehert, D.S. 2009. *Geomyces destructans* sp. nov., associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon*, 108(1): 147–154.
- Gray, M.J., Duffus, A., Haman, K.H., Harris, R.N., Allender, M.C., Thompson, T.A., Christman, M.R., Sacerdote-Velat, A., Sprague, L.A., Williams, J.M. & Miller, D.L. 2017. Pathogen surveillance in herpetofaunal populations: guidance on study design, sample collection, biosecurity, and intervention strategies. *Herpetological Review*, 48: 334–351.
- Greer, A.L., Schick, D.M. & Brunner, J.I. 2009. Guidelines for the safe use of disposable gloves with amphibian larvae in light of pathogens and possible toxic effects. *Herpetological Review*, 40(2):145–147.
- Hellebuyck, T., Pasmans, F., Blooi, M., Haesebrouck, F. & Martel, A. 2011. Prolonged environmental persistence requires efficient disinfection procedures to control *Devriesea agamarum*-associated disease in lizards. *Letters in applied microbiology*, 52(1): 28–32.
- Hernández, A., Martro, E., Matas, L., Martin, M. & Ausina, V. 2000. Assessment of *in-vitro* efficacy of 1% Virkon® against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. *Journal of Hospital Infection*, 46: 203–209.
- Johnson, M.L. & Speare, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 922–925.
- Johnson, M.L. & Speare, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases Aquatic Organisms*, 65: 181–186.
- Johnson, M.L., Berger, L., Phillips, L. & Speare, R. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 255–260.
- Jourdan, B., Hemmi, C., Allender, M.C., Levy, I., Foltin, E. & Keller, K.A. 2022. Effectiveness of common disinfecting agents against isolates of *Nannizziopsis guarroi*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 32(4): 16–22.
- Kim, R. & Faisal, M. 2011. Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (*Novirhabdovirus*, Rhabdoviridae, Mononegavirales). *Journal of Advanced Research*, 2(1): 9–23.
- Kolby, J.E., Ramirez, S.D., Berger, L., Richards-Hrdlicka, K.L., Jocque, M. & Skerratt, L.F. 2015. Terrestrial dispersal and potential environmental transmission of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *PLOS ONE*, 10: e0125386.
- Lammens, L., Martel, A. & Pasmans, F. 2021. Application of disinfectants for environmental control of a lethal amphibian pathogen. *Journal of Fungi*, 7(6): 406.
- Langdon, J.S. 1989. Experimental transmission and pathogenicity of epizootic hematopoietic necrosis virus (ehnv) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 12: 295–310.
- Latney, L.V. & Wellehan, J. 2020. selected emerging infectious diseases of squamata: an update. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animals*, 23: 353–371.
- Lorch, J.M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E.A., McCurley, K. & Blehert, D.S. 2015. Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *mBio*, 6: e01534–15. <doi.org/10.1128/mBio.01534-15>.
- Manire, C.A., Stacy, B.A., Kinsel, M.J., Daniel, H.T., Anderson, E.T. & Welleham, J.F.X. 2008. Proliferative dermatitis in a loggerhead turtle, *Caretta caretta*, and a green turtle, *Chelonia mydas*, associated with novel papillomaviruses. *Veterinary microbiology*, 130: 227–237.
- Marschang, R.E. 2019. Virology, 247–269. In: Divers, S.J. & Stahl, S.J. (eds.). *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery*. Elsevier - Health Sciences Division. Saint Louis, Missouri. USA.
- Martínez-Silvestre, A., Budó, J., Cufí, A., Soler, J. & Pfau, B. 2021. High prevalence of *Picornavirus* and *Mycoplasma* in free-living Hermann's tortoises *Testudo hermanni* in L'Albera Mountains, Catalonia (NE Spain). *Testudo*, 9: 37–46.
- Martínez-Silvestre, A., Gosá, A., Izagirre, A. & Rebollo Fernández, B. 2022. Proliferación cutánea deformante en lagarto verdinegro de Álava. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 33: 11–14.
- McAuliffe, L., Ellis, R., Miles, K., Ayling, R.D. & Nicholas, A.J. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152.4. <doi.org/10.1099/mic.0.28604-0>.
- Méndez, D., Webb, R., Berguer, L. & Speare, R. 2008. Survival of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*

- on bare hands and gloves: hygiene implications for amphibian handling. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82: 97–104.
- Muro, J., Canturri, A., Velarde, R., Martínez-Silvestre, A., Pastor, J., Lavín, S. & Marco, I. 2020. Atypical systemic mycobacteriosis in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 32: 8–12.
- Nazir, J., Spengler, M. & Marschang, R.E. 2012. Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98: 177–184.
- OMSA. 2010. *Manual de formación sobre las enfermedades y la vigilancia de los animales silvestres*. Organización Mundial de Sanidad Animal. París.
- OMSA. 2022a. *Código Sanitario para los Animales Terrestres y acuáticos*. Organización Mundial de Sanidad Animal. <<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=glossaire.htm>> [Consulta: 12 junio 2023].
- OMSA. 2022b. *Lista de enfermedades de Declaración Obligatoria*. Organización Mundial de Sanidad Animal. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animales/enfermedades-animales/?_tax_animal=acuaticos&_paged=2> [Consulta: 12 junio 2023].
- Phillott, A. & Parmenter, A. 2001. The distribution of failed eggs and the appearance of fungi in artificial nests of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *Australian Journal of Zoology*, 49: 713–718.
- Phillott, A.D., Speare, R., Hines, H.B., Skerratt, L.F., Meyer, E., McDonald, K.R. & Berger, L. 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2-3): 175–185.
- Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A. & Bosch, J. 2014. Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus. *Current Biology*, 24: 2586–2591.
- Ribas, M.P., Cabezón, O., Velarde, R., Estruch, J., Serrano, E., Bosch, J., Thumsová, B. & Martínez-Silvestre, A. 2022. Coinfection of chytrid fungi in urodeles during an outbreak of chytridiomycosis in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 58(3): 658–663.
- Rivera, S. 2022. Saprolegniasis. 402–403. In: Nevarez, J.G. (ed.). *Blackwell's five-minute veterinary consult: reptile and amphibian*. Wiley Blackwell. Hoboken. USA.
- Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B.R., Rouffaer, L.O., Van Praet, S. & Schaub, M. 2017. Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature*, 544: 353–356.
- Svoboda, J., Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E. & Petrušek, A. 2017. Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(1): 127–140.
- Thomas, V., Van Rooij, P., Meerpoel, C., Stegen, G., Wauters, J., Vanhaecke, L., Martel, A. & Pasmans, F. 2020. Instant killing of pathogenic chytrid fungi by disposable nitrile gloves prevents disease transmission between amphibians. *PLOS ONE*, 15: e0241048.
- Thumsová, B., Bosch, J. & Rosa, G.M. 2023. Amphibian crisis and the impact of emerging pathogens. 54–102. In: Moreno-Rueda, G. & Comas, M. (eds.). *Evolutionary Ecology of Amphibians*. CRC Press. Boca Raton. USA.
- UE. 2016. Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 84/1, de 31/03/2016.
- UE. 2018a. Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control de categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista. *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 308/21, de 04/12/2018.
- UE. 2018b. Decisión de Ejecución (UE) 2018/320 de la Comisión, de 28 de febrero de 2018, relativa a determinadas medidas zoonitarias de protección para los intercambios comerciales de salamandras en el interior de la Unión y para la introducción en la Unión de estos animales en relación con el hongo *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 62/18, de 05/03/2018.
- UE. 2019. Decisión de Ejecución (UE) 2019/1998 de la Comisión, de 28 de noviembre de 2019, por la que se modifica la Decisión de Ejecución (UE) 2018/320 en lo que respecta al período de aplicación de las medidas zoonitarias de protección para salamandras en relación con el hongo *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 310/35, de 02/12/2019.
- UE. 2020. Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002 de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad. *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 412/1, de 08/12/2020.
- UE. 2021. Decisión de Ejecución (UE) 2021/361 de la Comisión, de 22 de febrero de 2021, por la que se establecen medidas de emergencia para los desplazamientos entre Estados miembros y la entrada en la Unión de partidas de salamandras en relación con la infección por *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Diario Oficial de la Unión Europea* (DOUE) L 69/12, de 26/02/2021.
- Vemulapally, S., Villamizar, A., Guerra, T., Tociłowski, M.E., Spradley, M., Mays, S. & Hahn, D. 2021. Mycobacteria in skin lesions and the habitat of the endangered houston toad (*Anaxyrus houstonensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 57(3): 503–514.
- Von Essen, M., Leung, W.T.M., Bosch, J., Pooley, S., Ayres, C. & Price, S.J. 2020. High pathogen prevalence in an amphibian and reptile assemblage at a site with risk factors for dispersal in Galicia, Spain. *PLOS ONE*, 15: e0236803.