
Estudi ecopatològic de les tortugues invasives (*Trachemys* sp.) del pantà de Foix: detecció de *Salmonella* sp.

Albert Martínez,
Joaquim Soler
i Victòria Agustí

CRARC
(Centre de Recuperació d'Amfibis
i Rèptils de Catalunya)

Resum

Des de fa ja cinc anys s'està fent un seguiment de les tortugues invasives del pantà de Foix (grup *Trachemys* i similars) mitjançant captures i observacions de les àrees de distribució. Amb els animals capturats, durant l'any 2003, s'ha fet un estudi histològic sobre la presència de malalties en aquestes espècies. Posteriorment, l'any 2004 s'ha iniciat un estudi microbiològic dirigit a aïllar la presència de l'agent bacterià *Salmonella* a l'aparell digestiu d'aquestes tortugues (transmissió horitzontal). Un altre treball s'ha dirigit a fer el cultiu de *Salmonella* des dels ous d'aquestes tortugues (transmissió vertical). La presència del bacteri ha estat demostrada en el 10% dels animals mostrejats. S'ha aïllat una variant de *Salmonella* que encara està en procés de classificació taxonòmica pel Laboratori de Sanitat Ramadera de la Generalitat de Catalunya. S'adverteix del risc potencial que comporta la presència de *Trachemys* a les aigües del Foix no sols des del punt de vista ecològic sinó també des del punt de vista sanitari i ambiental (cap a altres espècies) i zoonòtic (cap a les persones).

Paraules clau

Trachemys, *Salmonella*, estudi microbiològic, transmissió horitzontal, transmissió vertical, risc ecològic, risc sanitari

Resumen

Estudio ecopatológico de las tortugas invasoras (*Trachemys* sp.) del pantano de Foix: detección de *Salmonella* sp.

Desde hace ya cinco años se está haciendo un seguimiento de las tortugas invasoras del pantano de Foix (grupo *Trachemys* y similares) mediante capturas y observaciones de las áreas de distribución. Con los animales capturados, durante el año 2003, se ha hecho un estudio histológico sobre la presencia de enfermedades en estas especies. Posteriormente, en el año 2004, se ha iniciado un estudio microbiológico para aislar la presencia del agente bacteriano *Salmonella* en el aparato digestivo de estas tortugas (transmisión horizontal). Otro trabajo se ha dirigido a hacer el cultivo de *Salmonella* desde los huevos de estas tortugas (transmisión vertical). La presencia de la bacteria ha sido probada en el 10% de los animales muestreados. Se ha aislado una variante de *Salmonella* que aún está en proceso de clasificación taxonómica por el Laboratorio de Sanidad Ganadera de la Generalitat de Catalunya. Se advierte del riesgo potencial que conlleva la presencia de *Trachemys* en aguas del Foix no sólo desde el punto de vista ecológico sino también desde el punto de vista sanitario y ambiental (hacia otras especies) y zoonótico (hacia las personas).

Palabras clave

Trachemys, *Salmonella*, estudio microbiológico, transmisión horizontal, transmisión vertical, riesgo ecológico, riesgo sanitario

Abstract

Ecopathological study of the invasive turtles (*Trachemys* sp) at the Foix reservoir: detection of *Salmonella* sp.

For five years the invasive turtles at Foix reservoir (*Trachemys* and similar) have been monitored by capture and observation in the distribution areas. With the animals captured, in 2003 a histological study was made of the presence of diseases in these species. Later, in 2004 a microbiological study was launched to isolate the presence of the bacterial agent *Salmonella* in these turtles' digestive apparatus (horizontal transmission). Another study has made a cultivation of *Salmonella* from the eggs of these turtles (vertical transmission). The presence of bacteria has been demonstrated in 10% of the animals sampled. A variant of *Salmonella* has been isolated and is in process of taxonomic classification by the Catalan Government Livestock Health Laboratory. The study warns of the potential risk of the presence of *Trachemys* in the waters of the Foix, not only from the ecological but also from the sanitary and environmental (to other species) and the zoonotic point of view (to people).

Keywords

Trachemys, *Salmonella*, microbiological study, horizontal transmission, vertical transmission, ecological risk, sanitary risk

Introducció

La presència de tortugues exòtiques al pantà de Foix està documentada des de fa ja més de cinc anys. El nombre d'espècies detectades cada any és variable i depèn dels alliberaments incontrolats per part dels visitants del parc, així com de les captures o la pesca accidental. A partir de l'any 2000 es van començar a realitzar estudis en alguns exemplars capturats per veure de quina manera interaccionaven amb l'hàbitat i si això podria repercutir negativament en la seva conservació. Els estudis realitzats fins ara se centren en l'anàlisi *post-mortem* de teixits i cultius microbiològics, tant dels ous com de la flora cloacal d'aquests rèptils.

Material i mètodes

La metodologia per a la detecció de les espècies presents al parc ha estat bàsicament la visualització directa i la captura d'exemplars mitjançant trapes. La visualització s'ha realitzat seguint trajectes mensuals tot vorejant el parc amb l'ús de binocles, telescopis i càmeres amb zoom, durant quatre anys. La identificació de les espècies ha estat *in situ* o bé a partir de la fotografia, per la llarga distància a la qual es troben alguns exemplars. La captura s'ha realitzat mitjançant trapes del tipus nansa per a la captura d'anguiles i ja provades com a bon sistema per a la captura de tortugues a altres parcs com Doñana (Hidalgo, com. pers.) o el delta de l'Ebre i el delta del Llobregat (Andreu, com. pers.; Bertolero, com. pers.). Ha estat, a més, molt important la col·laboració de la gent que ha recollit tortugues i les ha portat a la central de guardes del parc.

La metodologia per a la determinació microbiològica es va fer mitjançant hisops de punta fina de marca Eurotubo (IASA, Rubí) i amb medi de transport de Stuart. La metodologia d'aïllament va ser l'oficial per a l'aïllament de *Salmonella* i seguint el mètode ISO 6579: 2002. Segons aquest mètode, es realitza un preenriquiment en aigua peptonada a 37°C durant 18-19 hores. Posteriorment, es realitza un enriquiment selectiu en medi tetratrat i Rappaport a 41°C per acabar en medi Rappaport semisòlid modificat a 37°C. Els cultius d'aïllament es realitzen en Agar XLT4 i Agar XLD. La identificació específica dels bacteris es va realitzar segons el mètode de sistema d'identificació de gramnegatius VITEK.

Mètode de presa de mostra microbiològica

Per a cada tortuga es va desinfectar l'exterior de la cloaca amb una solució de povidona iodada (Desinпов, laboratoris Wicam, Madrid). Posteriorment, l'hisop es va introduir a l'interior de la cloaca seguint pel coprodeu fins a 2 cm de profunditat. Es va mantenir en medi de transport de Stuart fins a l'arribada al laboratori.

Per als ous, es va usar una femella que feia una setmana que havia ingressat al CRARC. Set dies després va fer la posta i els ous es van recollir a mesura que sortien de la cloaca de la femella i, evitant el contacte amb el terra, quatre ous es van introduir en un recipient estèril prèviament a la remissió al laboratori.

La majoria de les mostres van ser enviades fresques dins de les dotze hores posteriors a la presa de mostres. Les mostres agafades durant l'estiu van ser congelades per evi-

tar el deteriorament tèrmic fins a l'arribada al laboratori (la congelació no afecta el desenvolupament posterior de *Salmonella*). A fi que el temps d'incubació fos l'adequat per al desenvolupament bacterià, les lectures de desenvolupament es van realitzar entre un i quatre dies després de la sembra. Els organismes van ser identificats per les característiques de creixement de les colònies i per reaccions bioquímiques en els panells ja descrits.

Mètode de presa de mostra per a histologia

Totes les tortugues van ser sacrificades amb injecció endovenosa de pentobarbital (Pentotal, Merck), seguint els criteris d'ús de mètodes ràpids i humanitaris descrits a la bibliografia. Així mateix, també es disposà de la certificació de personal investigador de la Generalitat de Catalunya per a la realització de totes les actuacions descrites. La necròpsia es va realitzar seguint el protocol sistemàtic de necròpsies en tortugues i les mostres es van introduir en formol al 4%. Posteriorment es van incloure en blocs de parafina, tallats en microtalls de 5 µm i tenyits amb hematoxilina/eosina per al seu posterior estudi histològic.

Resultats

Tortugues

Les espècies detectades al Parc del Foix en els transcurso d'aquests quatre anys són les següents:

Trachemys scripta elegans. Detecció constant des de 1996. Reproducció confirmada: localitzats ous, nius amb ous, nius depredats i cries inferiors a l'any de vida.

Trachemys scripta scripta. Un individu observat el 2002. Tres individus capturats en anys posteriors. Reproducció no confirmada.

Pseudemys floridiana. Un individu aïllat el 2000. Reproducció no confirmada. Un individu fotografiat i no capturat.

Gratemys pseudogeographica. Un individu observat el 2001. Diversos individus capturats els anys posteriors. Reproducció no confirmada.

Emys orbicularis. Dos individus observats i fotografiats el 2002. Reproducció no confirmada. Un individu capturat i marcat el 2004.

Mauremys leprosa. L'única espècie autòctona del parc. Reproducció confirmada. Sembla tenir poblacions grans i estables, tot i que a àrees com l'Estanyol o la Marina la *Trachemys* sembla guanyar terreny.

Histologia general

Els resultats d'aquestes anàlisis resumides i agrupades per òrgans són els següents:

- Pàncrees: S'ha detectat un cas de pancreatitis infecciosa.
- Pulmons: S'han detectat dos casos de pneumònia catarral, ambdós d'origen infeccios.
- Fetge: El 75% de les tortugues tenia lipoidosi hepàtica en major o menor grau. En un cas la lipoidosi coincidia amb un procés inflamatori (hepatitis) lleu.
- Melsa: La depleció linfoide s'ha detectat en deu animals.
- Ronyons: S'ha detectat nefritis intersticial en tres casos.
- Intestí prim: No s'ha detectat cap malaltia destacable.
- Ovaris: Totes les femelles estaven amb ovulació a terme o amb posta incipient.

- Folicles madurs en perfecte estat.
- Cap malaltia a l'aparell reproductor.

Microbiologia

Els resultats dels cultius cloacals es mostren en les taules 1 i 2. L'aïllament de *Salmonella* de l'aparell digestiu de les dues tortugues ha permès identificar dues variants del bacteri. La primera variant s'ha classificat com a *Salmonella* subespècie 1, serovariant *lindern/charity*, amb fórmula antigènica 6,14: d: e, n, x. La segona variant ha estat *Salmonella* subespècie 4, fórmula antigènica 44:z4,z23:-. Ambdues es consideren *Salmonelles* estranyes pel que fa als aïllaments rutinaris en aliments i semblen bacteris propis de l'aparell digestiu d'aquestes tortugues. En qualsevol cas, podem afirmar que no es tracta de la *Salmonella* alimentària o contaminant fruit d'una contaminació externa en el moment de la presa de mostres.

Taula 1. Presència de *Salmonella* a les mostres cloacals agafades de 22 individus.

Mostres	<i>Salmonella</i>	Altres bacteris
Ous	1/12 (8,33 %)	Enterobacteris <i>Bacillus</i> sp
Cloacals	2/20 (10 %) Serotip?	Esterobacteris totals (1,11 fins a $9,05 \times 10^7$ ufc/g)

Taula 2. Presència d'enterobacteris i *Salmonella* als quatre ous analitzats.

Núm. d'ou	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Bacillus</i>
1	–	+	+
2	+	+	+
3	–	+	+
4	–	+	+

Discussió

La confirmació de *Salmonella* en un dels ous ha permès incloure aquest risc potencial en la transmissió del bacteri als ecosistemes, tant sigui per contaminació als seus depredadors (transmissió horitzontal) com a les cries que neixin d'aquests ous (transmissió vertical); fet que representa, doncs, un risc potencial per al medi ambient de l'embassament de Foix.

És un fet ja descrit que la temperatura d'incubació als cultius bacteriològics de mostres de rèptils és un dels factors més importants que cal considerar. La temperatura corporal de la majoria de rèptils és inferior a la dels animals homeotermes i, en conseqüència, els bacteris aïllats poden tenir una adaptació a aquesta, i realitzar un desenvolupament important a temperatures inferiors a les esperables. Tot i així, i en concordança amb el present estudi, la majoria d'autors coincideixen en la realització de lectures de cultius incubats entre 20 i 37°C.

El gènere *Salmonella* és un microorganisme comunalment aïllat en animals heterotermes aparentment sans, i és considerat per molts autors com a resident habitual de l'aparell digestiu de les tortugues. Estudis d'aquest bacteri en cocodrils demostren que la seva presència és constant, però s'han de conèixer les espècies presents i la seva sensibilitat tant en animals captius com salvatges, a fi d'evitar

processos que afectin la conservació dels que la tenen o del seu entorn. En aquest punt, hem de considerar que la variant de *Salmonella* trobada en les tortugues del Foix no es comuna i encara s'han d'efectuar proves que determinin l'espècie o serotipus que permeti assegurar si pot representar algun risc addicional per a l'ecosistema. Segons altres estudis, sembla que en els llocs on els rèptils estan en condicions de superpoblació o captivitat, hi ha més possibilitats d'aïllament d'aquest bacteri que en un estat lliure en densitats normals (PASMANS *et al.*, 2000). El gènere *Salmonella* sembla aïllar-se freqüentment de la vesícula biliar d'aquestes tortugues, per la qual cosa es creu que aquest òrgan actua com un reservori i allibera el bacteri al contingut intestinal de manera intermitent. Això provoca dificultats per a l'eradicació d'aquest agent, que quedarà arraconat en els animals vius de manera estable. Només si la tortuga sofreix un procés d'immunodepressió el bacteri pot arribar a eliminar-se especialment. La causa rau en el fet que el sistema immunitari de la tortuga és molt vulnerable a canvis tèrmics, estrès, càrrega parasitària, dietes errònies, fam, etc. Les tortugues assilvestrades i les que provenen de captivitat pateixen tots aquests factors. Ho demostra el fet que la gran majoria de tortugues analitzades tenia algun tipus de procés lligat a la captivitat i a la seva posterior solta en el medi (lipoïdosi hepàtica, pneumònia, etc.). Des d'aquest punt de vista, l'aïllament de *Salmonella* en aquestes tortugues es considera potencialment patògen no només per a la tortuga que el porta sinó per al medi natural i per a les persones, i això ens ha d'alertar, per tant, del risc zoonòtic que representa.

A més, considerem que els motius que porten la gent a deixar tortugues exòtiques als rius solen anar precedits d'un període en el qual la tortuga té una vida considerablement precària, no exempta de patir malalties. A més, quan els propietaris les alliberen, solen estar ja malaltes, o immunodeprimides i llestes per emmalaltir.

Conclusions

1. El bacteri *Salmonella* ha estat aïllat dels ous i dels aparells digestius de les tortugues exòtiques (*Trachemys scripta*) del pantà de Foix.
2. A més, s'han detectat altres patologies no relacionades directament amb el bacteri, però que poden afavorir la seva presència (lipoïdosi hepàtica, pneumònia, pancreatitis).
3. Les tortugues assilvestrades són potencials portadors d'agents patògens a l'ecosistema del Foix, a la resta de vertebrats de la cadena tròfica d'adults i ous, i fins i tot a les persones que usen aquest espai natural.
4. El nombre d'espècies invasives al parc està creixent en els darrers quatre anys.
5. S'han d'articular les mesures que siguin necessàries per disminuir el nombre de tortugues invasives i potenciar el seguiment científic d'aquestes poblacions, a fi de conèixer el grau d'eliminació de patògens al medi ambient.

Agraïments

Volem expressar el nostre agraïment a totes les persones i laboratoris que ens han ajudat en la tasca descrita en aquest treball, especialment a la Dra. Montserrat Saco, del Labo-

ratori de Sanitat Ramadera (Generalitat de Catalunya), Sonia Tellez, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Complutense de Madrid, i a la Guarderia del Parc del Foix.

Bibliografia

BOYER, T. H. (1992). «Bacterial culture and sensitivity». *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 2(1): 6.

FORREST, L. (1998). «Humane euthanasia». *The biology, husbandry and health care of reptiles*: 871-875. Nova Jersey: Ackerman, L. (Ed.).

MADSEN, M.; HANGARTNER, P.; WEST, K.; KELLY, P. (1998). «Recovery rates, serotypes, and antimicrobial susceptibility patterns of Salmonellae isolated from cloacal

swabs of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*)». Zimbabwe. *J. Zoo Wild. Med.* 29(1): 31-34.

MARTÍNEZ SILVESTRE, A. (2002). «Anàlisi de les tortugues invasives a l'àrea natural del Foix-Garraf». *Trobades d'Estudiosos del Garraf* VI: 24.

MARTÍNEZ SILVESTRE, A.; SOLER MASSANA, J.; MEDINA, D. (2001). «Hygiene and the prevention of zoonosis transmission from reptiles to humans». *Reptilia: The European Herp Magazine*, 15: 10-16.

PASMANS, F.; HERDT, P. DE; CHASSEUR-LIBOTTE, M.L.; BALLASINA, D.L. PH.; HAESEBROUCK, F. (2000). «Occurrence of Salmonella in tortoises in a rescue centre in Italy». *Veterinary Record* 146: 256-258.

REDROBE, S.; MACDONALD, J. (1999). «Sample collection and clinical pathology of reptiles». *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal practice*, 2(3): 709-730.