

# Clamidiosi: una nova malaltia emergent vinculada al tràfic il·legal en el tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*)

ALBERT MARTÍNEZ-SILVESTRE<sup>1</sup> i ELENA OBÓN LOSADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC)

<sup>2</sup>Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrussa

## Resum

L'abril de 2020 es van decomissar 97 salamandres i tritons protegits a Barcelona. Entre ells hi havia deu exemplars de *Calotriton arnoldi*. D'aquests, tres exemplars tenien un índex de condició corporal de 2/5, amb simptomatologia cutània, i cinc exemplars van morir. Als animals se'ls va practicar nombroses anàlisis sanitàries. Els resultats van ser negatius a tots els patògens, tret de la *Chlamydia*. També n'hi havia d'altres de l'espècie *C. asper* malalts que també van ser positius a *Chlamydia*. Es va practicar una nova anàlisi amb control negatiu dels *Calotriton arnoldi* utilitzats per a la cria. Els resultats van ser novament positius a *Chlamydia* per als tritons decomissats i negatius en la població control. Els animals van ser tractats amb antibiòtic, cosa que els va permetre assolir una clara millora, guany de pes i PCR negatives. Els afectats curats no podran ser alliberats ni utilitzats en cap programa de cria.

## Paraules clau

*Calotriton arnoldi*, *Chlamydia*, malaltia emergent, tràfic

## Resumen

### Clamidirosis: una nueva enfermedad emergente vinculada al tráfico ilegal en el tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*)

En abril de 2020 se decomisaron 97 salamandras y tritones protegidos en Barcelona. Entre ellos había 10 ejemplares de *Calotriton arnoldi*. De estos, 3 ejemplares tenían un índice de condición corporal de 2/5, con sintomatología cutánea, y 5 de ellos murieron. A los animales se les practicaron numerosos análisis sanitarios. Los resultados fueron negativos a todos los patógenos, excepto a *Chlamydia*. También había otros de la especie *C. asper* enfermos que fueron también positivos a *Chlamydia*. Se realizó un nuevo análisis con control negativo de los *Calotriton arnoldi* utilizados para la cría. Los resultados fueron nuevamente positivos a *Chlamydia* para los tritones decomisados y negativos para la población control. Los animales fueron tratados con antibiótico, por lo que lograron una clara mejora, ganancia de peso y PCR negativos. Los afectados curados no podrán ser liberados ni usados en ningún programa de cría.

## Palabras clave

*Calotriton arnoldi*, *Chlamydia*, enfermedad emergente, tráfico

## Abstract

### *Chlamydiosis: a New Emerging Disease Related to Illegal Trade in the Montseny Brook Newt (Calotriton arnoldi)*

In April 2020, 97 protected salamanders and newts were seized in Barcelona. Among them were 10 specimens of *Calotriton arnoldi*. Three of these specimens had a body condition index of 2/5 with cutaneous symptoms and five of them died. Numerous health tests were carried out on the animals. The results were negative for all pathogens except *Chlamydiosis*. There were also other diseased *C. asper* species which were *Chlamydiosis* positive too. A new negative control test was performed on the *Calotriton arnoldi* used for breeding. The results were again positive for *Chlamydiosis* in the seized newts and negative in the control population. The animals were treated with antibiotics and therefore showed marked improvement, weight gain and negative PCR. Healed animals may not be released or used in any breeding programme.

## Key words

*Calotriton arnoldi*, *Chlamydiosis*, emerging disease, trafficking

## Introducció

Durant la primavera del 2020 hi va haver una intervenció policial en una col·lecció privada a Barcelona que mantenia amfibis urodels (salamandres i tritons). Les instal·lacions tenien un gran nombre d'espècies, tant exòtiques com autòctones ibèriques. Entre les espècies autòctones, se'n van detectar deu exemplars de tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en dos aquaris. Aquesta espècie està protegida i la seva possessió particular està estrictament prohibida, així que tots els tritons van ser decomissats i traslladats a les instal·lacions del centre de fauna de Torreferrussa i posteriorment al CRARC. Els animals van ser posats en tractament i aïllats de la població reproductora del pla de cria. Fins a la data de la redacció d'aquest document, han mort cinc individus.

## Material i mètodes

Es van recollir mostres cutànies amb hisop per un estudi mitjançant la tècnica de PCR dels patògens *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), *Ranavirus* (*Rv*), *Salmonella* i *Chlamydia*, unes malalties descrites en urodels captius i com a causes principals de mortalitat en altres països associades al col·leccionisme (BALAMAYOORAN *et al.*, 2021).

Les mostres per a aquestes determinacions van consistir en hisops cutanis (excepte per a *Salmonella* i *Chlamydia*, que va ser cloacal) i mantingudes en refrigeració fins a l'arribada al laboratori. Les anàlisis de qPCR es van practicar segons BOYLE *et al.* (2004) per a *Bd*, un singleplex modificat de BLOOI *et al.* (2013) per a *Bsal*, i LEUNG *et al.* (2017) per a *Rv*. Les anàlisis per al PCR de *Salmonella* es van practicar segons MARTI *et al.* (2013) i RENFERT *et al.* (2019). El PCR de *Chlamydia* es va practicar utilitzant com a PCR-Target el gen RNA ribosomal 23S, que detecta genèricament tots els membres de la família Chlamydiaceae (PANTCHEV *et al.*, 2006).

Els animals morts van ser analitzats mitjançant necròpsies completes i anàlisis histopatològiques. Es van prendre mostres de vísceres internes (fetge, estómac, melsa, ronyó, gònada i intestí), i de pell per descartar la presència de lesions causades pels principals patògens d'amfibis i confirmar els resultats obtinguts amb la qPCR.

## Resultats

Tots els animals tenien un índex de condició corporal de 2/5, i manifestaven signes de desnutrició i feblesa, així com letargia, despigmentació irregular, edema subcutani i petèquies cutànies (petites hemorràgies puntuals) en àrees ventrals i digitals (figura 1).

Els resultats van ser negatius en *Salmonella*, *Bd*, *Bsal* i *Rv*, però positius a *Chlamydia* a tots els animals. Davant d'aquest diagnòstic es va repetir el test de *Chlamydia* amb els tritons del programa de cria com a control negatiu. Novament els tritons decomissats van ser positius, així com els controls van ser negatius.

Es va practicar un tractament amb antibiòtic (doxiciclina) que va fer que els animals sortissin negatius en anàlisis posteriors (un mes després), però van tenir brots i recidives diversos mesos més tard.

La histologia dels tritons morts va mostrar congestió esplènica i àrees de congestió discreta i edema cutanis, si bé no va permetre visualitzar cap patògen en concret. Així mateix, es va confirmar la negativitat als altres patògens analitzats.

**Figura 1. Dos exemplars de tritó del Montseny positius a *Chlamydia* i amb simptomatologia cutània. Hi destaquen les àrees afectades per congestió i despigmentació a la part ventral i les extremitats**



## Discussió

*Chlamydia* és un bacteri sense paret cel·lular, paràsit intracel·lular obligat, que forma inclusions intracitoplàsmiques a les cèl·lules infectades (DENSMORE; EARL-GREEN, 2007). L'animal malalt manifesta quadres clínics variables segons l'espècie de *Chlamydia* i el grau d'afectació, varien des dels asimptomàtics fins als afectats greument i morts, i inclouen presentacions rares com poliencfalomielitis o ganglionitis (FRATZKE *et al.*, 2019). Tots els signes descrits en aquest cas són coinci-

dents amb la patogenicitat descrita per a la *Chlamydia* en amfibis (TAYLOR *et al.*, 2001). Dins el grup de *Chlamydia* hi ha diverses espècies patògenes que es poden detectar en els amfibis: *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia abortus*, si bé la més comuna que produeix malaltia és *Chlamydia pneumoniae*. També s'ha descrit una espècie pròpia de salamandres dins aquest grup: *Amphibiichlamydia salamandrae* (MARTEL *et al.*, 2012). Als Estats Units, el bacteri *Chlamydia* explicava el 19 % de causes de mortalitat en un estudi retrospectiu sobre mortalitat en amfibis en captivitat (BALAMAYOORAN *et al.*, 2021).

El diagnòstic final es confirma bàsicament en unir la simptomatologia amb els resultats per PCR i la resposta al tractament, ja que les lesions de necròpsia i les histològiques no són característiques de clamidiosi si no es fa immunohistoquímica específica per a aquest patogen (MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2020).

Aquest bacteri forma cossos de persistència, cosa que en fa molt difícil l'eradicació a llarg termini i converteix aquests tritons en portadors permanents irrecuperables. Fins ara aquest agent tan sols s'ha descrit en estat salvatge en anurs com *Mixophyes iteratus* a Austràlia (BERGER *et al.*, 1999) o *Rana temporaria* a Suïssa (BLUMMER *et al.*, 2007), per això es considera una malaltia emergent de risc a la resta del món que pot ser introduïda i associada principalment en manipulacions i transport no controlades d'amfibis salvatges (FÈLIX, 2016; MCNAMARA *et al.*, 2018) com el cas que aquí s'exposa. Aquest cas és un exemple clar del risc elevat que hi ha d'introducció de malalties emergents a través del mercat il·legal de fauna salvatge, i que poden tenir resultats devastadors si es propaguen en llibertat. És a conseqüència d'aquest greu cas que cal recomanar fer un seguiment preventiu periòdic d'aquesta malaltia en la població salvatge de *Calotriton arnoldi* al Montseny.

## Agraïments

Els autors volen expressar el seu agraïment per la resposta ràpida i actuació professional, en aquest cas, de les persones i entitats següents: el cos de bombers de la ciutat de Barcelona; la policia local (Guàrdia Urbana) de Barcelona; la Unitat Regional de Medi Ambient, Barcelona (URMA) i l'Àrea Central de Medi Ambient (ACME) del cos de Mossos d'Esquadra; F. CARBONELL, M. ALONSO, R. LARIOS, R. GUTIÉRREZ i D. NICOLAU, del Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrussa; R. CASANOVAS i V. CADENAS, del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya; Z. ALONSO i J. SOLER (CRARC); Laboratoris Laboklin (LABOKLIN, BadKissingen, Alemanya); R. VELARDE, de la Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona; J. BOSCH i B. THUMSOVA (Programa SOS ANFIBIOS, AHE) per la seva col·laboració en les tasques diagnòstiques. Aquest estudi ha estat cofinançat pel programa «Life Tritó del Montseny» (LIFE15 / NAT/ES/000757) i Forestal Catalana (Generalitat de Catalunya).

## Bibliografia

- BALAMAYOORAN, G.; SNOOK, E.; TOCIDLOWSKI, M.; FLANAGAN, J.; SIMS, W.; HELMAN, G.; DÍAZ-DELGADO, J. (2021): «Retrospective Survey of Amphibian Pathology Cases at Texas A&M University System (2016-2020)». *Journal of Comparative Pathology*, núm. 185; p. 87-95.
- 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*, núm. 37; p. 2378-2380.
- BLUMMER, C.; ZIMMERMANN, D. R.; WEILENMANN, R.; VAUGHAN, L.; POSPISCHIL, A. (2007): «Chlamydiae in free-ranging and captive frogs in Switzerland». *Veterinary Pathology*, núm. 44; p. 1.
- BLOOI, M.; PASMANS, F.; LONGCORE, J. E.; SPITZEN VAN DER SLUIJS, A.; VERCAMMEN, F.; MARTEL, A. (2013): «Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples». *Journal of Clinical Microbiology*, núm. 51; p. 4173-4177.
- BOYLE, D. G.; BOYLE, D. B.; OLSEN, V.; MORGAN, J. A. T., HYATT, A. D. (2004): «Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay». *Diseases of Aquatic Organisms*, núm. 60; p. 141-148.
- DENSMORE, C. L.; EARL-GREEN, D. (2007): «Diseases of amphibians». *ILAR Journal*, núm. 48; p. 235-245.
- FRATZKE, A.; HOWARD, L. L.; TOCIDLOWSKI, M. E.; ARMIÉN, A.; OLIVEIRA, F.; RITCHIE, B.; SNOOK, E. (2019): «*Chlamydia pneumoniae* polyencephalomyelitis and ganglionitis in captive Houston toads (*Anaxyrus houstonensis*)». *Veterinary pathology*, núm. 56(5); p. 789-793.
- LEUNG, W. T. M.; THOMAS-WALTERS, L.; GARNER, T. W. J.; BALLOUX, F.; DURRANT, C., PRICE, S. J. (2017): «A quantitative-PCR based method to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultra-conserved vertebrate target». *Journal of Virological Methods*, núm. 249; p. 147-155.
- MARTI, R.; ZURFLUH, K.; HAGENS, S.; PIANEZZI, J.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. J. (2013): «Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize *Salmonella* OmpC». *Molecular Microbiology*, núm. 87; p. 818-834. <<https://doi.org/10.1111/mmi.12134>>.
- MARTEL, A.; ADRIAENSEN, C.; BOGAERTS, S.; DUCATELLE, R.; FAVOREEL, H.; CRAMERI, S.; HYATT, A. D.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. (2012): «Novel Chlamydiaceae disease in captive salamanders». *Emerging Infectious Diseases*, núm. 18; p. 1020-1021.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; OBÓN, E.; TARRAGÓ, A. (2020): «Primer diagnóstico de *Chlamydia* en tritón del pireneo (*Calotriton asper*) y tritón del Montseny



- (*Calotriton arnoldi*) vinculada al coleccionismo ilegal de anfibios». *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, núm. 31; p. 173-176.
- MCNAMARA, S.; WLIZLA, M.; HORB, M. E. (2018): «Husbandry, general care, and transportation of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Xenopus*». *Humana Press*, New York, NY; p. 1-17.
- PANTCHEV, A.; BAUERFEIND, R.; SACHSE, K.; TYCZKA, 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 4th Annual Workshop of COST Action 855 «Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications*». Edinburgh. Regne Unit.
- RENFERT, K.; RABSCH, W.; FRUTH, A.; SPECK, S.; PEES, M. (2019): «The use of a salmonella bacteriophage in bearded dragons: Application, passage time and reisolation». *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*, núm. 47; p. 247-256. <<https://doi.org/10.1055/a-0959-5528>>.
- TAYLOR, S.; GREEN, E.; WRIGHT, K. M.; WITAKER, B. R. (2001): «Bacterial Diseases». A: WRIGHT, K. M.; WHITAKER, B. R. (ed.). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Florida. USA: Malabar, Kreger, p. 159-179.