

Prevalência de *Cryptosporidium serpentis* em serpentes de cativeiro

Prevalence of *Cryptosporidium serpentis* in captive snakes

Paulo Custório Ruggiero^I Rogério Loesch Zacariotti^{II,III} Eduardo Fernandes Bondan^{III}
Maria Anete Lallo^{II}

- NOTA -

RESUMO

Cryptosporidium é um protozoário encontrado em uma grande variedade de espécies animais como responsável por casos de gastrite e enterite, porém com epidemiologia pouco conhecida em animais silvestres. A presente investigação teve como objetivo avaliar a prevalência de *Cryptosporidium serpentis* em lavado gástrico de serpentes mantidas em cativeiro no serpentiário do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). A coleta foi realizada uma semana após alimentação, evitando, assim, a regurgitação devido à manipulação. Foram realizados esfregaços do sedimento do lavado gástrico, obtido por centrifugação, corados pela técnica de coloração de Kinyoun. Parte do sedimento foi submetido à técnica de RFLP-PCR para identificação da espécie de *Cryptosporidium*. O serpentiário é dividido em três seções, por espécie - a primeira com oito jibóias (*Boa constrictor amarali*), a segunda com dez jararacas (*Bothropoides jararaca*) e a última com sete cascavéis (*Caudisona durissa*). A prevalência de *C. serpentis* encontrada neste estudo para as serpentes *C. durissa*, *B. jararaca* e *Boa c. amarali*, foi de 57,14% (04/07), 40% (04/10) e 37,5% (03/08), respectivamente, revelando importante ocorrência desse protozoário em serpentes de cativeiro. Apesar da alta prevalência encontrada, apenas as jibóias apresentaram sintomas como perda de peso e regurgitação, refletindo uma sensibilidade diferente da espécie para *C. serpentis*.

Palavras-chave: *Bothropoides jararaca*, *Boa constrictor*, *Caudisona durissa*, criptosporidiose, prevalência, cobras.

ABSTRACT

Cryptosporidium is a protozoan found in a wide variety of animal species which is responsible for gastritis and

enteritis, but its epidemiology is poorly known in wild animals. The present investigation aimed to evaluate the prevalence of *Cryptosporidium serpentis* in gastric aspirate of captive snakes from the public serpentarium of the Butantan Institute (São Paulo, Brazil). Sampling was performed preferably one week after feeding, thereby preventing regurgitation due to manipulation. Smears were done from the gastric aspirate sediment obtained by centrifugation and stained by Kinyoun technique. Part of the pellet was submitted to RFLP-PCR technique for amplification of *Cryptosporidium* segment (833bp, CSP01) of SSU rRNA gene. The serpentarium was divided in three sections by species - the first housing eight Amaral's Boa (*Boa constrictor amarali*), the second with ten jararacas (*Bothropoides jararaca*) and the last one with seven south american rattlesnakes (*Caudisona durissa*). The prevalence of *C. serpentis* found in this study for the snakes *C. durissa*, *B. jararaca* and *B. constrictor* was 57.14% (04/07), 40% (04/10) and 37.5% (03/08), respectively, thus revealing the high occurrence of this protozoan among captive snakes. Despite the high prevalence found, only *B. constrictor amarali* presented symptoms as regurgitation and weight loss, probably due to a different sensibility of this species to *C. serpentis*.

Key words: *Bothropoides jararaca*, *Boa constrictor*, *Caudisona durissa*, cryptosporidiosis, prevalence, snakes.

Cryptosporidium é um protozoário importante para a área médica como agente causal de quadros de diarreia. Foi amplamente diagnosticado em mamíferos, aves e em aproximadamente 80 espécies de serpentes, lagartos e tartarugas (FAYER, 2010). Os oocistos de *Cryptosporidium* liberados pelas fezes de

^IUniversidade Cruzeiro do Sul (Unicsul), São Paulo, RS, Brasil.

^{II}Programa de Pós-graduação em Imunopatologia, Universidade Paulista (UNIP), Rua Dr. Bacelar 1212, 4º andar, 04026-002, São Mirandópolis, SP, Brasil. E-mail: anetelallo@hotmail.com.br. *Autor para correspondência.

^{III}Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

seus hospedeiros são muito resistentes às condições ambientais e podem ser transmitidos pela água, o que contribui para a disseminação do parasito em criatórios de animais (XIAO, 2004). Diferentemente de outros animais, nos quais as infecções por *Cryptosporidium* são autolimitantes em indivíduos imunocompetentes, a criptosporidiose em répteis é frequentemente crônica e pode ser letal para serpentes (O'DONOGHUE, 1995). Entre as várias espécies de *Cryptosporidium* identificadas, duas são mais comuns em répteis (FAYER et al., 2000; XIAO, 2000; FAYER, 2004): *C. serpentis* em serpentes e *C. varanii* (sin. *C. saurophilum*, PAVLASEK & RYAN, 2008) em lagartos. Elas diferem entre si pela morfologia e localização no hospedeiro, uma vez que *C. serpentis* possui oocistos de tamanho maior e se desenvolve no estômago e *C. varanii* localiza-se no intestino de seu hospedeiro e tem oocistos menores. Em serpentes, as infecções causadas por esse protozoário determinam sintomas relacionados com gastrite crônica, anorexia, regurgitação pós-prandial, letargia, edema na região mediana do corpo e perda de peso (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009). A criptosporidiose está associada à alta morbidade e mortalidade em centros de criação de ofídios ou em coleções privadas, muitas vezes, resultando em eutanásia obrigatória dos animais. Dificilmente a doença é diagnosticada em seus estágios iniciais ou subclínicos, sendo esse o grande motivo de preocupação para os clínicos de répteis, já que a doença pode se disseminar rapidamente por toda a criação (ALVES et al., 2005).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi o de investigar a prevalência de *Cryptosporidium* em serpentes mantidas em cativeiro. Foram avaliadas 25 serpentes, de três diferentes espécies, mantidas no serpenteiro do Instituto Butantan de São Paulo. Três espécimes de *B. Constrictor amarali* apresentavam perda de peso progressiva, regurgitação e anorexia, fato que motivou a realização da pesquisa desse parasito.

No referido Instituto, os animais são mantidos em serpenteiro externo, recoberto com gramínea e com a presença de algumas árvores, sendo dividido em três recintos separados por um muro. Cada espécie de serpente ocupava um dos recintos e somente havia contato entre exemplares da mesma espécie. Os animais foram distribuídos da seguinte forma: oito jiboias (*B. constrictor amarali*), 10 jararacas (*B. jararaca*) e sete cascavéis (*C. durissa*). Todos os animais envolvidos neste estudo eram procedentes da natureza, por esta razão não foi possível avaliar suas idades, sendo possível determinar apenas que eram adultos.

Os responsáveis pela manutenção do serpenteiro caminham livremente de um recinto para o outro, sem troca ou higienização dos calçados, assim

como os utensílios utilizados na higienização também são compartilhados entre os serpenteiros. Quinzenalmente, os animais são alimentados com camundongos ou ratos criados em laboratório. A água (tratada) é oferecida aos animais *ad libitum*.

Para evitar a regurgitação devido à manipulação, a coleta das amostras foi realizada uma semana após a alimentação das serpentes. O conteúdo gástrico foi coletado após a contenção física dos animais, utilizando-se para o procedimento um tubo plástico e gancho herpetológico. Os animais não foram anestesiados para tal procedimento. Com auxílio de uma sonda gástrica flexível, foram administrados de 20 a 40mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% no estômago do animal. Após leve massagem na região ventral correspondente à área gástrica, o conteúdo gástrico foi aspirado, empregando-se uma seringa acoplada à sonda gástrica (GRACZYK et al., 1996).

O material obtido (entre 20 e 40mL) foi colocado em tubo cônico de polipropileno (com 50mL de capacidade) e mantido sob refrigeração, por no máximo 24 horas, sendo posteriormente processado. Inicialmente, após a tamisação da amostra, o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 3500g por minuto. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e três esfregaços foram confeccionados a partir do sedimento. As lâminas eram secas à temperatura ambiente e fixadas em metanol por 5 minutos. Empregou-se a técnica modificada de Kinyoun a frio, preconizada por De CARLI (2007), para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium*. As lâminas coradas foram observadas em microscópio de luz com objetiva de 40 ou 100 vezes de aumento óptico. Para todas as amostras positivas, cerca de 10 oocistos de *Cryptosporidium* foram medidos com ocular micrométrica e com objetiva de 100, sendo calculada a média do comprimento e da largura dos oocistos com intervalo de confiança de 95% (De CARLI, 2007).

Com o sedimento obtido anteriormente, procedeu-se à extração do DNA utilizando-se o mini kit QIAampDNA (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). A PCR foi realizada em tubos com capacidade de 500µL, contendo 10µL de tampão de reação (KCl 500mM, MgCl₂ 15mM, Tris-HCl 100mM - pH 9,0), 0,8µL de dNTP *mix* (200µM de cada oligonucleotídeo), 25pmol de cada iniciador 18S Fwd (5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') e 18S Rev (5'- TGATCCTTCTGCAGGTTACCTA-3') e 2,5UI de *Taq* DNA polimerase (Biogen) (XIAO et al., 2004), 10µL da amostra de DNA e água q.s.p., num volume final de 100µL (LALLO & BONDAN, 2006) e com *Hot Start* a 94°C por 10min.

As reações foram realizadas em termociclador modelo TC-480 (Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, USA). A PCR foi realizada com 35 ciclos de

desnaturação a 94°C por 60seg, anelamento a 55°C por 60seg e extensão a 72°C por 90seg, com um ciclo de extensão final de 72°C por 10min, sendo posteriormente armazenadas a 4°C. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os géis foram corados em solução de 5g mL⁻¹ de brometo de etídio e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta, com digitalização das imagens (Kodak) (LALLO & BONDAN, 2006). Para a identificação da espécie de *Cryptosporidium* por RFLP-PCR, foram utilizadas 20U da enzima de restrição *SspI* (New England BioLabs, Beverly, Mass) e 20U de *VspI* (Gibco BRL, Grand Island, NY), de acordo com as recomendações do fabricante, em 20µL do produto da PCR para cada enzima. Os produtos da digestão foram corados por brometo de etídio e observados em gel de agarose a 2%.

O teste de duas proporções (Teorema do limite central com aproximação normal) foi utilizado para verificar se a diferença entre as prevalências encontradas entre as espécies era significativa estatisticamente.

A coleta das amostras uma semana após a alimentação não causou nenhum episódio de regurgitação ou qualquer comprometimento no processo de digestão dos animais, conforme já havia sido observado por GRACZYK et al. (1996). Para todos os animais avaliados, conseguiu-se aspirar ao menos 50% da solução de cloreto de sódio administrada, sendo a mesma solução utilizada para a pesquisa de oocistos do protozoário. Esse mesmo resultado foi observado por GRACZYK et al. (1996), sendo, portanto, bastante eficaz para a coleta de amostras e investigação de parasitos gástricos.

A mensuração dos oocistos revelou que eles apresentaram, em média, 5,5-6,5µm de comprimento por 4,8-5,6µm de largura. Tais medidas são características do *C. serpentis*, conforme PLUTZER & KARANIS (2007). Várias espécies de *Cryptosporidium* estão envolvidas nas infecções de serpentes e incluem *C. crotalis*, *C. serpentis*, *C. parvum*, *C. varanii* e *C. muris* (ALVES et al., 2005; PLUTZER & KARANIS, 2007; KUROKI et al., 2008), porém a mais prevalente é *C. serpentis* e foi a única espécie encontrada neste estudo.

Os resultados obtidos pela RFLP-PCR da SSU rRNA revelaram que todos os animais foram positivos com *C. serpentis* evidenciada pela enzima de restrição (*SspI*), que gerou duas bandas visíveis de 414 e 363 pares de bases, as quais não são observada em outras espécies como *C. parvum*, *C. muris*, *C. wrairi* e *C. baileyi* (XIAO et al., 2004).

A prevalência geral de *C. serpentis* foi de 44% entre todos os animais pesquisados, sendo que o maior número de positivos foi observado entre as cascavéis (*C. durissa*), com 57,14% (04/07) dos animais investigados

apresentando o protozoário. As jararacas (*B. jararaca*) apresentaram 40% (04/10) de prevalência e as jiboias (*B. constrictor amarali*) 37,5% (03/08) de positividade para *C. serpentis*. GRACZYK et al. (1996) observaram 48% e 40% de prevalência de *Cryptosporidium* sp., respectivamente, em lavados gástricos e amostras fecais coletados de serpentes de vários gêneros (*Epicrates*, *Candoia*, *Pituophis*, *Lampropeltis*, *Elaphe*), resultados bastante semelhantes aos obtidos no presente estudo. Por outro lado, KARASAWA et al. (2002) encontraram 14% de prevalência de *Cryptosporidium* sp. em lavados intestinais de cascavéis (*C. durissa*) e atribuíram essa baixa ocorrência à técnica utilizada para o diagnóstico, empregando esfregaços fecais. A maior eficiência dos lavados gástricos para o diagnóstico de criptosporidiose subclínica em serpentes já havia sido demonstrado por GRACZYK et al. (1996) e pode ser reforçada pelos resultados encontrados neste estudo, que demonstrou maior prevalência do parasito em cascavéis (*C. durissa*), com 57,14%.

Surtos de criptosporidiose têm sido descritos em colônias de serpentes de cativeiro (RATAJ, 2011). Assim como observado para outros coccídios, as condições e a contaminação do meio ambiente são fundamentais para que a infecção possa se disseminar rapidamente (FAYER, 2010). No presente estudo, encontrou-se a maior prevalência nas cascavéis, o grupo que envolvia a maior população por área. O grupo de menor prevalência foi o das jiboias, as quais viviam em um recinto proporcionalmente maior e com uma densidade de animais muito menor, quando comparado aos outros. Embora a contaminação do meio ambiente propicie a disseminação do parasito pela água ou alimentos, não se pode afirmar que os casos de criptosporidiose relatados neste estudo estejam diretamente relacionados com essas condições. É provável que algumas alterações de manejo possam contribuir para uma menor ocorrência de coccídios como *Cryptosporidium* spp. em ambientes restritos. Elas incluem: limpeza semanal, drenagem de água de chuva, adequação do número de animais ao recinto e tratamento adequado da água com ozônio (SCULLION & SCULLION, 2009).

Apenas três espécimes de jiboias apresentaram sintomas e sinais clínicos característicos da infecção por *C. serpentis*, tais como, caquexia e regurgitação. Os animais morreram ao longo do estudo e foram submetidos à necropsia. Em todos foram encontradas lesões que caracterizaram gastrite severa compatível com a criptosporidiose.

Por meio deste estudo, pode-se concluir que a prevalência de criptosporidiose em serpentes mantidas em cativeiro foi alta e que a infecção se apresentava na forma subclínica na maioria dos animais, sendo que

apenas as jiboias manifestaram a forma clínica da criptosporidiose.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Otavio A. V. Marques e à Dra. Selma M. Almeida-Santos do laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, por possibilitar a realização deste trabalho, e aos estagiários que auxiliaram neste projeto.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. **Parasitology Research**, v.97, p.108-112, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/w10002.dotlib.com.br/content/p03725052363m271>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1007/s00436-005-1384-9.
- De CARLI, G.A. et al. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: De CARLI, G.A. **Parasitologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.213-264.
- FAYER, R. et al. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1305-22, 2000. Disponível em: <<http://ddr.nal.usda.gov/dspace/bitstream/10113/25814/1/IND22091149.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00135-1.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.37-56, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004066>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.004.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, p.90-97, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409000666>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005.
- GRACZYK, T.K. et al. Diagnosis of subclinical cryptosporidiosis in captive snakes based on stomach lavage and cloacal sampling. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.143-151, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401796010400>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/S0304-4017(96)01040-0.
- KARASAWA, A.S.M. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in *Caudisona durissa terrificus* (Serpentes, Viperidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.779-781, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600004>>. Acesso em: 01 set. 2011.
- KUROKI, T. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in snakes in Japan. **Parasitology Research**, v.103, p.801-805, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/w10002.dotlib.com.br/content/p22805217m26658v/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1007/s00436-008-1045-x.
- LALLO, M.A.; BONDAN, E.F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.40, p.120-125, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102006000100019&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1590/S0034-89102006000100018.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v.25, p.139-195, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751994E0059V>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/0020-7519(94)E0059-V.
- PAVLASEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v.118, p.434-437, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489407002445>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/j.exppara.2007.09.006.
- PEDRAZA-DÍAZ, S. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.204-210, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708006390>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1016/j.vetpar.2008.11.003.
- PLUTZER, J.; KARANIS, P. Molecular identification of *Cryptosporidium saurophilum* from corn snake (*Elaphe guttata*). **Parasitology Research**, v.101, p.1141-1145, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/w10002.dotlib.com.br/content/g530112638687346>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1007/s00436-007-0569-9.
- SCULLION, F.T.; SCULLION, M.G. Gastrointestinal protozoal diseases in reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.18, p.266-278, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155750630900113X>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi:10.1053/j.jepm.2009.09.004.
- RATAJ et al. Parasite in pet reptiles. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.53, p.33, 2011. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/53/1/33>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1186/1751-0147-53-33.
- XIAO, L. et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5492-5498, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92489/pdf/am005492.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011.
- XIAO, L. et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.891-899, 2004. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/70/2/891.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011. doi: 10.1128/AEM.70.2.891-899.2004.