

KARINA RODRIGUES DOS SANTOS

**IMPLICAÇÕES DO PARASITISMO POR NEMATÓDEOS DO  
GÊNERO *Rhabdias* (NEMATODA, RHABDIASIDAE) EM *Crotalus  
durissus terrificus* (SERPENTES, VIPERIDAE): ALTERAÇÕES  
PULMONARES, MICROBIOLÓGICAS E HEMATOLÓGICAS**

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo José da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária

Botucatu – SP  
2005

Aos meus pais:

Eunice Rodrigues dos Santos e Milton Mendes dos Santos:

De vocês recebi o maior dom do Universo, a vida. Com muito amor e carinho seguraram minhas mãos para que eu pudesse dar os primeiros passos; e em meus tombos, suas mãos estavam sempre ali para me levantar. Vocês que em minha época de escola muitos choros agüentaram. Desde muito cedo sonhavam com o que eu seria quando crescesse? Sofreram comigo nos exames vestibulares, torceram por mim, fizeram festa em minha aprovação! Junto com ela veio a tristeza da separação, das despedidas. Esperavam-me sempre de braços abertos, nos finais de semana que eu voltava para casa para uma rápida visita. Daí veio a tão sonhada formatura e o nosso sonho realizado. Mas não acabou por aí, veio à residência e mais uma felicidade em nossas vidas! Mas uma tristeza pelo fato de minhas visitas se espaçarem mais. Após mais essa etapa vencida veio o mestrado, que não foi nada fácil, voltava menos ainda para casa, pelo fato de estar sem bolsa, e vocês estavam sempre ali me apoiando, não só financeiramente, mas me apoiando quando o estudo era um fardo pesado e os meus ideais pareciam distantes, mas mesmo tão longe de mim, sempre compartilhavam dos meus cansaços, das minhas preocupações e até nos momentos que eu nem mesmo sabia que era capaz, vocês tinham a certeza de que eu conseguiria e se orgulhavam de mim. Hoje, meus pais, tenho certeza que este é mais um sonho nosso que está sendo realizado. Procuo palavras para agradecer-lhes, mas é impossível! Sou grata a vocês, sobretudo por afastarem do meu caminho todos os contratemplos, por me manterem segura o suficiente para acreditar que estava fazendo sozinha. Meu agradecimento sem tamanho pelos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse receber esse título de Mestre em Medicina Veterinária. Que vocês continuem caminhando ao meu lado como sempre fizeram e que possam presenciar e comemorar cada vitória que eu alcançar.

Agradeço aos meus irmãos Marco Aurélio Rodrigues dos Santos e Thiago Rodrigues dos Santos que também me ajudaram assim como meus pais em todas as etapas aqui colocadas. Estavam sempre ao meu lado me apoiando, respeitando minha ausência, e quando me viam em mais uma de minhas visitas, me dispensavam um pouco de seus tempos para nossas papos e brincadeiras.

Em especial, agradeço ao meu orientador Reinaldo José da Silva, por todo o apoio, dedicação e amizade e principalmente pela confiança depositada em minha pessoa, possibilitando assim a realização de meu sonho. Obrigada por estar sempre presente, por ser um ótimo orientador. Não tenho palavras para agradecer-lhe tudo o que faz e sempre fez por mim.

## AGRADECIMENTOS:

Aos professores: **Regina Kiomi Takahira**, Professor **Raimundo Souza Lopes** e Professora **Aguemi Kohaygawa**, que me abriram as portas de entrada a Botucatu e me aceitaram na grande família do Laboratório Clínico Veterinário. Cada um destes professores teve uma participação especial em minha vida profissional e pessoal.

Ao Professor **Raimundo** pelos ensinamentos, pelas dicas, pelas oportunidades, por me permitir que fosse seu braço direito em minha residência.

À **Regina**, hoje minha co-orientadora, pela amizade, pelos gestos e palavras amigas, pelos ensinamentos, auxílio em muitos trabalhos idealizados. Quantas manhãs e noites que lhes foram dispensados, sem você, muitos deles não teriam sido realizados.

À Professora **Aguemi** por me permitir fazer parte de sua família de pós-graduandos, por me permitir ser sua agregada, nunca me esquecerei, e nunca deixarei de ser grata por todos os ensinamentos que me tem passado, pelos conselhos, e até mesmo pelos ouvidos que me emprestou quando precisei.

Aos bolos e aos cafezinhos e as conversas com os funcionários do laboratório Clínico, **Sueli**, **Soninha** (em memória), **Wilson** e Senhor **Matiazze**.

Às amigas **Mere Érica Saito**, **Lívia Figueiredo**, **Graziela Barioni** e **Ana Cláudia dos Santos Valente**, que me acolheram na república “Coração-de-mãe”: Quantas brincadeiras e risadas! Quantas bagunças! Além dos conselhos valiosos que recebi, e que guardo com muito carinho. Também agradeço a estas mesmas amigas, e aos amigos **Cleverson de Souza**, **Joandes Henrique Fonteque**, **Luciana Langrafe**, **Camilo Bulla**, por todo carinho, brincadeiras, risadas, cantorias, mas

principalmente pela amizade e pela torcida na disputa pela vaga na residência em **Enfermidades Parasitárias**.

À cada dica e ensinamentos, que me foram passados pelos ex-residentes e amigos **Márcia Hasegawa e Rodrigo Gonzalez Rodrigues**.

À minha “companheira”, um apelido carinhoso colocado por mim em **Sônia Maria Santi**, que me foi como uma segunda mãe, puxava minha orelha quando tinha que puxar, mas também me ajudou muito; e me deu a oportunidade de conhecer seus belos filhos: Bruno e Gabriel.

Aos amigos e “vizinhos”, assim denominados por mim: **Marlene, Maricélia, Ana, Luis Cláudio Gameiro, Antônio Cláudio Morales Júnior, Cláudio Henrique Camargo, e João Borioli Cassetari**, pelos momentos de descontração na cozinha e nos corredores do Laboratório de **Enfermidades Parasitárias**.

Às longas conversas e boas risadas e principalmente pela amizade de minhas companheiras de residência, **Karla Conceição Higino de Campos, Veridiana da Silveira, Luciana Pereira Machado e Cláudio**.

Aos **estagiários** que passaram por minha residência, alguns me fizeram chorar com suas idas, porém foram muitos, seria injustiça de minha parte tentar citar o nome de todos e acabar me esquecendo de alguém. Mas eles sabem o quanto foram importantes para mim.

Foram vários os amigos que me emprestaram seus ombros e me ajudaram, mas tenho que agradecer a uma amiga que por muito tempo segurou a minha barra dividiu comigo alegrias e principalmente tristezas. Obrigada **Sandrita (Sandra)** pelas palavras de carinho, confiança e otimismo. Obrigada por sua amizade!

Obrigada aos meus amigos de faculdade que foram muitos, mas em especial a **Waleska, Raquel C. Lazine, Priscila, Denise, Ronaldo, Eduardo Romano, Carlos Eduardo (Caju), Fernanda, Jeffinho, Celina, Luíza, Professora Maria Adriana, Professora Sílvia Cortopassi, Professora Raquel**. Enfim, todos que fizeram parte de minha grande família em São João da Boa Vista.

À **Carminha** que trouxe minha carta de recomendação a Botucatu, abrindo-me as portas para chegar onde estou.

Aos professores da Parasitologia, do Instituto de Biociências, Professor **Alessandro**, Professora **Teresa Cristina**, Professor **Wesley Godoy**, Professora **Lucia Helena**, Professor **Nilton**, Professora **Luciene**, Professora **Semiramis** e Professor **Paulo**; que me acolheram em minha terceira casa em Botucatu e estavam sempre prontos a sanarem minhas dúvidas, quando lhes pedia por socorro. Obrigada também por todo o conhecimento que com humildade e carinho nos passam.

À minhas amigas, irmãs de república, algumas flutuantes que ficaram por pouco tempo, mas deixaram recordações, em especial fica meu muito obrigado a **Mere, Grazi, Livia, Ana, Karla, Letícia (pequena), Joandes, Telma, Viviane, Cynthia** e **Fabíola**, tenho certeza de que fomos e somos uma grande família; foram e ainda são maravilhosos os momentos que passamos juntos!! Cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração.

Aos amigos Pós-graduandos da Veterinária: **Eunicinha, Carlos Frederico (Fred), Celmira, Raquel Reis Martins, Flávia Quaresma, Flávia Santin, Adriane, Fabiana Ikeda**. São muitos os amigos. Obrigada, pois em muitos momentos de minha vida vocês me acompanharam, auxiliaram-me estavam sempre presentes nas alegrias ou tristezas, com alguns até me desentendi, mas sei que faz parte da vida.

Aos amigos **Paula Faciulli, Aline Otsuki, Edilaine C. Moretti, Jaqueline, Patrícia neves Batina, Ricardo Carlos, Jefferson, Nayro Xavier de Alencar**, minhas lembranças de momentos alegres, de troca de conhecimentos e amizade.

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Parasitologia que me receberam com muito carinho: **Milena, Cristiane, Renata, Gustavo, Jayme, Nelson, Marco, Rebeca, Patrizia e Raquel**. E aos novos companheiros de pós: **Adriano, Viviane, Marcela, Satie, Karina Paduan, Letícia, Diego, Aline, Gisele, Taís, Rogério, Carolina, Hiraldo, Laura, Regina Raquel e Telma**.

Aos funcionários e amigos **Ângela, Márcia, Nilza, Maria José, Valdir, Roberto e Heloy**, pelo grande auxílio a mim dispensado e pelas boas risadas na hora do cafezinho!

Aos colegas do CEVAP que muito me ajudaram e contribuíram para esse trabalho, o que seria de mim sem eles! **Thomaz, André, Fabiana e Tatiana**.

À todos da Microbiologia que conviveram comigo e me ajudaram durante toda a minha luta com a microbiologia - lá no fundo esquecida. Obrigada Professora **Vera**, Professora **Terue, Dito, Ariane, Fernanda, Márcia Furlan, Adenilson**.

Ao meu namorado e mais novo amigo **Fábio Roberto Bursaca**, que vem me emprestando seu ombro e ouvidos para minhas reclamações, com muita atenção, companhia e carinho. Não sabe o quanto tem me ajudado e tornado meu fardo mais leve, com seus conselhos e ensinamentos. Obrigada!

Às bibliotecárias e demais funcionários da biblioteca do Campus da Unesp de Botucatu.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu pela oportunidade de realização do mestrado.

À seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Unesp, Campus Botucatu. **Denise, Maria e Regina.**

À todos os que, direta ou indiretamente, ajudaram-me para a concretização desse trabalho. Agradeço aos que foram pacientes comigo, que puderam entender que não abandonei nenhum amigo. Estão todos em meu coração. Entretanto, para que eu chegasse a essa nova conquista, foi necessária uma pequena separação, uma sumida das festas e reuniões com os amigos uma fase em que distância foi inevitável.



À FUNDUNESP, pelo apoio financeiro, para  
a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

*“ Cada pessoa que passa em nossas vidas, passa sozinha, mas não vai só, nem nos deixa só! Leva um pouco de nós e deixa um pouco de si.”*

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Exemplar de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Serpentes, Viperidae) .....	13
Figura 2. Nematódeo do gênero <i>Rhabdias</i> coletado em pulmão de serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> : A) Morfologia geral da fêmea partenogenética; B) Esôfago [E] e anel nervoso [An]; C) Ânus [A]; D) Vulva [Vu]; E) Vulva e ovos [O]; F) Ovo.....	15
Figura 3. A) Caixa de contenção para aplicação do anestésico; B) Grade por onde era injetado o anestésico; C) Anti-sepsia do local de abertura da cavidade celomática da serpente; D) Abertura da cavidade celomática para coleta de sangue na veia cava; E) Retirada de sangue da veia cava; F) Exposição do pulmão, para sua retirada.....	23
Figura 4. A) Pulmão colocado em placa de Petri estéril para microbiologia; B) Fragmentos de pulmão colocados em solução salina (setas amarelas) e BHI (caldo infusão de cérebro e coração) (setas brancas); C) Amostras sendo semeadas em meios seletivos; D) Ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI); E) e F) Kits utilizados para identificação das bactérias, API 20 E (para enterobactérias e <i>Aeromonas</i> ) e API 20 NE (para bastonetes Gram-negativos não fermentadores) .....	25
Figura 5. Média da contagem de heterófilos, em cortes histopatológicos, de pulmão das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas (* $p < 0,05$ ) .....	28

Figura 6. Avaliação histopatológica das amostras de pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*: A) e B) Epitélio e parênquima pulmonar de animal parasitado, apresentando grande quantidade de infiltrado de granulocítico acidofílico (heterófilos) (setas); C) e D) epitélio e parênquima pulmonar de animal não parasitado; E) Edema e congestão pulmonar encontrados em um animal parasitado; F) Infiltrado heterofílico e mononuclear de animal parasitado ..... 29

Figura 7. Porcentagem de crescimento de colônias de bactérias nos pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias* ..... 30

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Procedência, data da coleta, sexo e informações sobre parasitismo das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> incluídas no estudo .....	19
Tabela 2. Espécies de bactérias identificadas em amostras de pulmões de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	31
Tabela 3. Avaliação hematimétrica de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	32
Tabela 4. Avaliação leucométrica de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	33

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	1
2. ABSTRACT .....	4
3. INTRODUÇÃO .....	7
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
4.1. Serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	12
4.2. O gênero <i>Rhabdias</i> em serpentes brasileiras .....	13
4.3. Infecção Bacteriana do trato respiratório .....	16
5. OBJETIVOS .....	17
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
6.1. Seleção dos animais .....	20
6.2. Coleta das amostras .....	21
6.3. Análise parasitológica das fezes .....	21
6.4. Fixação e análise morfológica dos helmintos pulmonares obtidos nos lavados traqueopulmonares.....	21
6.5. Exame histopatológico do pulmão .....	22
6.6. Exame microbiológico do pulmão .....	24
6.7. Exame hematológico .....	26
6.8. Análise estatística .....	26
7. RESULTADOS .....	27
7.1. Avaliação histopatológica das amostras de pulmões das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	28
7.2. Avaliação microbiológica dos pulmões das serpentes <i>Crotalus</i> <i>durissus terrificus</i> parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	30
7.3. Hematologia das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> parasitados e não parasitados por nematódeos do gênero <i>Rhabdias</i> .....	31
8. DISCUSSÃO .....	34

9. CONCLUSÕES .....	43
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1. RESUMO

SANTOS, K.R. Implicações do parasitismo por nematódeos do gênero *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae) em *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae): alterações pulmonares, microbiológicas e hematológicas. 2005. 52p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

A criação de serpentes em cativeiro vem se tornando atividade cada vez mais relevante, inicialmente para obtenção do veneno para produção dos soros antiofídicos e, mais recentemente, para o estudo de suas propriedades farmacológicas. Esta atividade, porém, tem esbarrado em alguns problemas, dentre os quais estão as doenças parasitárias que podem acometer estes répteis. Em regime de criação semi-extensiva, uma importante alteração observada é a presença de nematódeos do gênero *Rhabdias* em pulmão de serpentes. Particularmente, em *Crotalus durissus terrificus*, altas taxas de infecção pulmonar por estes nematódeos têm sido relatadas. Estudos sobre os efeitos da presença destes helmintos nos órgãos respiratórios de serpentes são escassos. O objetivo deste trabalho foi estudar as implicações da presença de nematódeos do gênero *Rhabdias* no pulmão de serpentes *C. d. terrificus*, através de avaliação histopatológica, microbiológica e hematológica de serpentes parasitadas e não parasitadas. Na análise histopatológica das amostras de pulmões de serpentes parasitadas observou-se epitélio e parênquima pulmonar, apresentando infiltrado de células granulocíticas e infiltrado mononuclear. Essas alterações também foram observadas em alguns animais não parasitados, mas em menor grau ( $p < 0,05$ ). Na análise microbiológica de animais parasitados, foram isoladas bactérias gram-negativas das seguintes espécies: *Citrobacter divergens*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter amnigenus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea spp.*, *Providencia rettgeri*. Nos pulmões de animais não parasitados foram identificadas as seguintes espécies: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*.



Em relação aos parâmetros hematológicos foi observado aumento de proteína plasmática e diminuição de linfócitos e dos valores normais de hemácias, nos animais parasitados. Concluímos que os nematódeos do gênero *Rhabdias* constituem importante problema de saúde para as serpentes e, portanto, todo animal introduzido em cativeiro deve ser tratado para eliminação destes parasitas.

Palavras chave: *Crotalus durissus terrificus*, serpentes, *Rhabdias* spp., Histopatologia, Microbiologia, Hematologia.

## 2. ABSTRACT

SANTOS, K.R. Implications of the parasitism for nematodes of the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae) in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae): pulmonary, microbiological and hematological alterations. 2005. 52p. Masters Dissertation – School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University – UNESP, Botucatu.

Snake breeding in captivity is becoming more and more important, initially to extract venoms for producing antivenom serum and, more recently, to study their pharmacological properties. This activity, however, has encountered some problems, including parasitic diseases that can attack them. In semi-extensive breeding systems, *Rhabdias* genus nematodes have been found in snake lung. High lung infection rates from these nematodes have been reported in *Crotalus durissus terrificus*. Studies on the effects of these helminths in the snake respiratory system are scarce. Our objective was to study the implications of nematodes of *Rhabdias* genus in *C. d. terrificus* lung through histopathological, microbiological, and hematological analysis of snakes with and without the parasite. Pulmonary parenchyma and epithelium with acidophilic granulocytic and mononuclear infiltrates were observed in histopathological analysis of parasite infested snake lung. These alterations were also observed in some non infested animals, but in a smaller degree ( $p < 0.05$ ). Microbiological analysis of infested animals revealed gram-negative bacteria: *Citrobacter divergens*, *Burlkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter ammnigenus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea* spp., *Providencia rettgeri*. In non infested lungs, the following species were indentified: *Burlkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*. In relation to hematological parameters, increased plasmatic protein, decreased lymphocytes and normal red blood cell values were observed in parasite infested animals. We concluded

that the nematodes of the genus *Rhabdias* cause significant health problems in snakes and so, all infected animal should be treated when they are maintained in captivity.

Key words: *Crotalus durissus terrificus*; snakes; *Rhabdias* spp.; Histopatology, microbiology, hematology.

### 3. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a criação de serpentes em cativeiro tornou-se atividade cada vez mais relevante, inicialmente pela obtenção do veneno para produção dos soros antiofídicos e, mais recentemente, para o estudo de suas propriedades farmacológicas. Pesquisas desenvolvidas com serpentes demonstraram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* possui atividade analgésica em camundongos (Giorgi *et al.*, 1993), que os venenos de *C. d. terrificus* e *Bothrops jararaca* apresentam importante efeito antitumoral sobre as células neoplásicas do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (Silva *et al.*, 1997, 2002a,b; Vieira Santos *et al.*, 2004) e que determinadas frações do veneno de *C. d. terrificus* possuem comprovada eficácia no fechamento de feridas decorrentes de biopsia em testículos de carneiros, funcionando como uma cola biológica (Sartori *et al.*, 1998).

Além destes aspectos científicos da criação de serpentes, recentemente tem aumentado na população brasileira, o hábito de manter serpentes como animais de companhia. Em função deste fato, foram instalados no Brasil alguns criadouros comerciais, autorizados e regulamentados oficialmente pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que reproduzem e comercializam serpentes não venenosas. No Brasil, a principal espécie criada em cativeiro para esta finalidade é a *Boa constrictor* (jibóia).

A criação de serpentes em cativeiro, principalmente em regime semi-extensivo, é uma atividade que expõe os animais à ação de diversos parasitos (Mader, 1996). A prevalência de parasitas de ciclo monoxênico é mais elevada do que aqueles de ciclo heteroxênico, pois este último necessita de um hospedeiro intermediário para que o ciclo se complete (Rey, 2001). A transmissão de parasitas de ciclo monoxênico é favorecida pelas condições físicas e orgânicas do cativeiro e desse modo, uma serpente pode contaminar outros animais ou mesmo se contaminar com formas infectantes presentes nas suas próprias fezes. Além disso, a condição de cativeiro ou o estresse relacionado a essa condição pode ser responsável pela aquisição ou pelo aumento da intensidade da infecção parasitária (Klingenberg, 1993).

No Brasil, vários estudos relatando a ocorrência de parasitos em serpentes têm sido descritos. Araujo *et al.* (1999) necropsiaram algumas espécimes de cascavéis (*C. d. terrificus*) e urutus (*Bothrops alternatus*), mantidas em cativeiro. Esses animais apresentavam anorexia, desidratação, diarreia, anemia e foram a óbito em torno de dois meses após o início dos sinais clínicos. Foram identificados, nesses animais, helmintos dos gêneros *Kalicephalus*, *Ophidascaris*, *Rhabdias* e *Oxyuris*; protozoários do gênero *Haemogregarina* (possivelmente, gênero *Hepatozoon*) e ácaros do gênero *Ophionyssus*.

Silva *et al.* (2001), estudaram a frequência de nematódeos em 24 exemplares de serpentes *C. d. terrificus* no cativeiro e encontraram parasitas no estômago (16,7%), intestino (12,5%) e pulmão (70,8%). Neste último, *Rhabdias labiata* foi a única espécie encontrada.

Grego (2000) estudou, durante doze meses, 138 ofídios da espécie *Bothrops jararaca*, provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo. Estas foram divididas em dois grupos: Grupo A, com 47 *B. jararaca* que foram eutanasiados e Grupo B, com 91 serpentes, que foram mantidas em serpentário externo aberto à visitação pública. No grupo A, 72,3% dos animais estavam parasitados, enquanto que no grupo B, 67%. Os parasitos identificados foram: *Sarcocystis* sp., *Caryospora* sp.; *Ochetosoma heterocoelium*, *Rhabdias vellardi*, *Kalicephalus inermis*, *Kalicephalus costatus*, *Ophidascaris* sp. e *Porocephalus* sp.

Barella e Silva (2003) descreveram a infecção por trematódeos digenéticos, parasitos da cavidade oral e esôfago em uma população de 250 serpentes da espécie *Bothrops moojeni*, provenientes de resgate de fauna em Porto Primavera, Estado de São Paulo. Os trematódeos encontrados foram: *Ophisthognimus* spp. e *Sticholecita serpentis*.

Dentre os helmintos que parasitam serpentes, tem sido observada a presença de nematódeos do gênero *Rhabdias*. Em *C. d. terrificus* a frequência de ocorrência de *Rhabdias* spp. têm sido relatada como muito alta (Araújo *et al.*, 1999; Grego, 2000; Silva *et al.*, 2001). Este nematódeo pode causar um quadro clínico denominado pneumonia verminótica tendo como sintomatologia a respiração ofegante, sempre com

a boca aberta (“gaping mouth and wheezing”) (Klingenberg, 1993; Rossi & Rossi, 1995). Entretanto, é descrito na literatura que essa pneumonia pode ser causada por outros agentes, entre eles vírus e bactérias, que poderiam estar associados à presença do verme (Silva *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2002).

Assim, constitui meta importante a investigação da presença de nematódeos do gênero *Rhabdias* spp. e as implicações da presença deste nematódeo no pulmão de serpentes *C. d. terrificus*, através de análise histopatológica, microbiológica e hematológica.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Serpentes *Crotalus durissus terrificus*.

A classe Reptilia contém 5.141 espécies divididas em quatro ordens e três subordens de répteis vivos, sendo as serpentes, pertencentes à ordem Squamata, subordem Ophidia (Wallach & Boever, 1983). O gênero *Crotalus* encontra-se classificado na infra-ordem Alethinophidia, superfamília Colubroidea, família Viperidae. Esta família compreende 17 gêneros, que possuem 202 diferentes espécies (McDowell, 1987).

O gênero *Crotalus* apresenta, atualmente, 27 espécies, que são caracterizadas por apresentarem um guizo na extremidade da cauda e numerosas pequenas escamas cobrindo o topo da cabeça. Nenhum outro gênero tem esta combinação de características. Coletivamente, membros deste gênero ocorrem desde o sul do Canadá até a Argentina, e desde locais abaixo do nível do mar até quatro mil metros de altitude. São encontradas em uma grande variedade de habitats e o veneno produzido pelas diferentes espécies apresenta muita variabilidade na sua composição e efeitos (Mattison, 1996).

No Brasil, há apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, reconhecendo-se atualmente seis subespécies: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. trigonicus* e *C. d. terrificus*. São serpentes conhecidas popularmente como cascavel, cascavel de quatro ventos, cobra de guizo, boicininga, maracá, boiquira ou maracabóia (Soerensen, 1990; Silva, 2000).

A *C. d. terrificus* (Figura 1) ocorre em áreas dos Estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. É uma serpente de porte relativamente grande, podendo chegar a um metro ou mais, com alguns machos ocasionalmente excedendo a um metro e meio, e distingue-se das outras subespécies por apresentar a parte interna das manchas dorsais apenas mais claras do que os bordos. Aparecem em ambientes secos e rochosos de vegetação baixa, sendo raramente encontradas em florestas, e predominando em campos e plantações ricas em pequenos roedores, dos quais se alimentam. Com

exceção do bote, estas serpentes são de movimentos lentos e pouco agressivas (Soerensen, 1990; Mattison, 1996; Silva, 2000).

O veneno da *C. d. terrificus* tem atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante. No local da picada pode haver edema discreto e raramente eritema, com dor pouco intensa ou ausente, e sensação de adormecimento. As complicações mais graves do acidente crotálico são a insuficiência respiratória aguda, transitória e muito rara, e a insuficiência renal aguda, freqüente nos casos graves tratados tardiamente e de forma inadequada. O tratamento fundamental consiste na aplicação do soro anticrotálico em dose e via adequadas (Azevedo-Marques *et al.*, 1992).

Não encontramos trabalhos relativos à sanidade de serpentes em vida livre. Entretanto, temos observado que, assim como as aves e os mamíferos, os répteis são susceptíveis a infectar-se com uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes ectoparasitas (Silva, 2000).



**Figura 1.** Exemplar de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae).

#### **4.2. O gênero *Rhabdias* em Serpentes Brasileiras.**

A família Rhabdiasidae possui dois gêneros em serpentes: *Rhabdias* e *Acanthorhabdias*. Trabalhos com nematódeos desses gêneros em serpentes foram publicados por diversos autores. Pereira (1927) criou o gênero *Acanthorhabdias* e

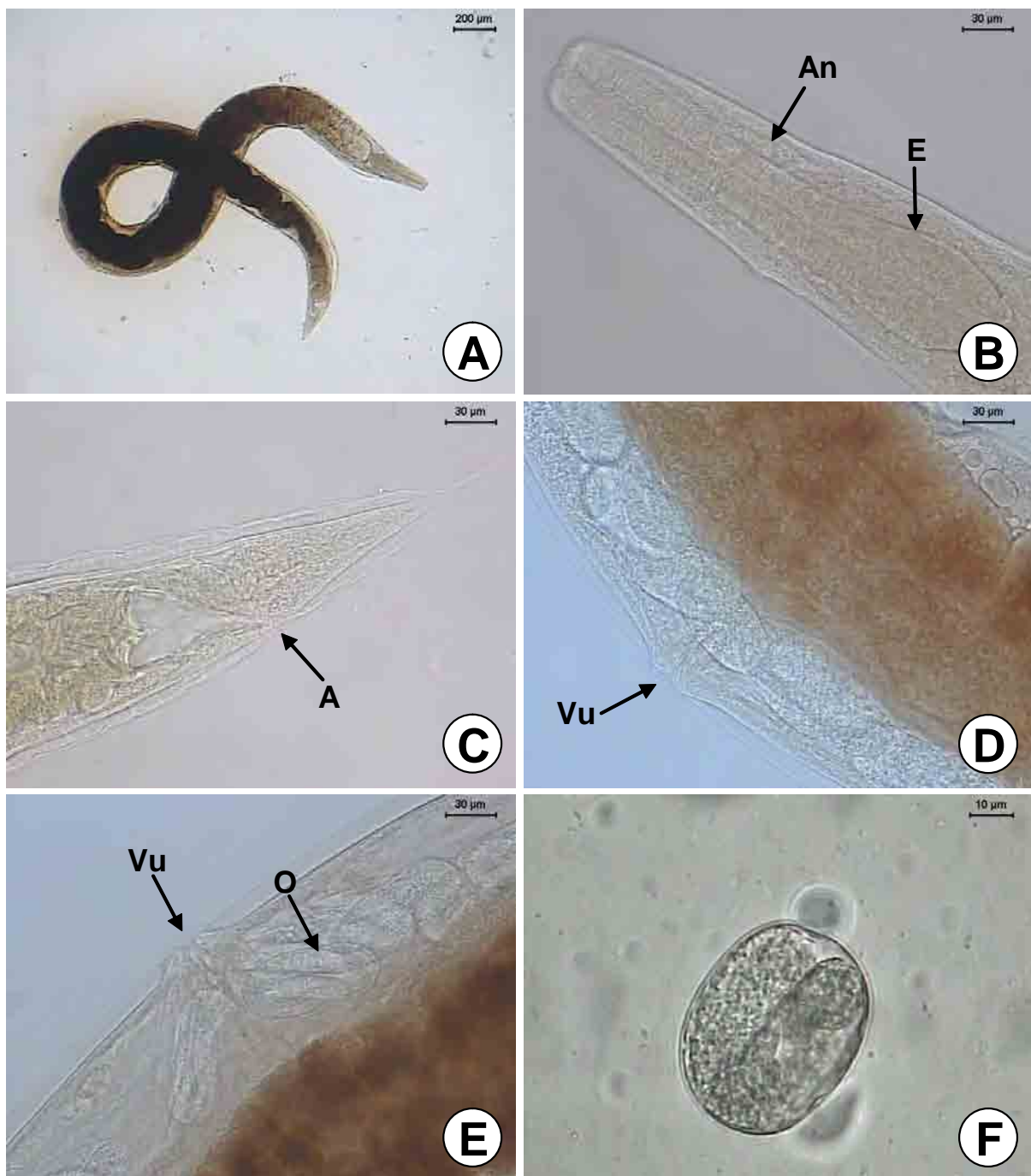


descreveu *Acanthorhabdias acanthorhabdias* como espécie-tipo, parasitando pulmão de *Rhadinea merremi* (= *Liophis miliaris*). Em outros trabalhos foram descritas as espécies *Rhabdias labiata* (Pereira, 1927) e *Rhabdias vellardi* (Pereira, 1928).

Posteriormente, Artigas *et al.* (1973) e Fernandes e Souza (1974) redescobriram *Acanthorhabdias acanthorhabdias*. Trabalhos publicados posteriormente relataram a ocorrência destes nematódeos em pulmão de diversas serpentes brasileiras (Araújo *et al.*, 1999; Grego, 2000; Silva *et al.*, 2001; Nogueira, 2004).

Os nematódeos do gênero *Rhabdias* (Figura 2) apresentam uma fase de vida livre e uma fase parasitária. Na fase de vida livre existem representantes machos e fêmeas e na fase parasitária, apenas a fêmea partenogênica (Pereira, 1927, 1928). Para a identificação precisa destes nematódeos é necessária a caracterização morfológica de todas as formas evolutivas do parasita, ou seja, ovo, larva, macho e fêmea de vida livre e a fêmea parasita. Kloss (1971) relata que é muito difícil, ou praticamente impossível, caracterizar uma espécie do gênero *Rhabdias* apenas pela análise das formas parasitas. Salienta este autor que, para uma correta identificação da espécie, é necessário estudar morfológicamente todas as formas evolutivas do parasito.

As principais características destes nematódeos são: presença de exemplares da geração parasitária com dimensões maiores que os de vida livre. Boca rodeada por seis lábios muito pequenos. Algumas vezes com asas laterais que são mais largas na parte anterior. Cápsula bucal em forma de taça. Esôfago pequeno, cilíndrico, terminando em uma dilatação posterior. Cauda cônica. Vulva próxima do meio do corpo. Fêmeas didelfas, anfidelfas e ovíparas. Ovos de casca fina contendo uma mórula ou larva pouco desenvolvida (Figura 2). Geração de vida-livre com sexos separados, com boca sem lábios, pequena cavidade bucal presente. Esôfago com dilatação pré-bulbar piriforme. Machos de vida-livre com cauda cônica, pequeno espinho terminal e estreita asa caudal. Papilas caudais presentes. Espículos iguais, curtos e grossos. Fêmeas de vida-livre com cauda cônica, vulva ligeiramente após a região mediana do corpo. Anfidelfas, com poucos ovos grandes. Embriões desenvolvidos no útero (Pereira, 1927, 1928; Vicente *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Nematódeo do gênero *Rhabdias* coletado em pulmão de serpente *Crotalus durissus terrificus*: A) Morfologia geral da fêmea partenogênica; B) Esôfago [E] e anel nervoso [An]; C) Ânus [A]; D) Vulva [Vu]; E) Vulva e ovos [O]; F) Ovo.

### 4.3. Infecção Bacteriana do Trato Respiratório.

*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Arizona* e *Klebsiella* são bacilos Gram-negativos comumente implicados em estomatite, abscessos da cavidade oral, pneumonias e septicemias em serpentes de várias espécies, em cativeiro (Page, 1961, Heywood, 1968, Marcus, 1971, Esterabadi *et al.*, 1973, Hess & Rudy, 1974, Boever & Williams, 1975, Cooper & Leakey, 1976, Jacobson, 1978, Cambre *et al.*, 1980, Iizuka *et al.*, 1983/84, Calixto *et al.*, 1986, Hipolito *et al.*, 1987, Rossi & Rossi, 1995, Orós *et al.*, 1996, Orós *et al.*, 1997).

Hilf *et al.* (1990), com a hipótese de que os mais comuns patógenos bacterianos envolvidos em pneumonias de serpentes provavelmente eram aqueles da flora normal da cavidade oral e do trato respiratório superior, conduziram um inquérito bacteriológico prospectivo da flora do trato respiratório superior de oito serpentes da família Boidae, em cativeiro no Zoológico de Pittsburgh, pelo período de um ano. Relataram, então, que o bacilo Gram-negativo mais comumente isolado foi *Providencia rettgeri*, e que em serpentes com pneumonia o número de bacilos Gram-negativos foi significativamente maior que em serpentes normais. De duas serpentes que vieram a óbito em consequência de pneumonia, de uma isolou-se maciçamente *Aeromonas hydrophila* e da segunda *Salmonella* sp., *Citrobacter* sp. e *Enterococcus* sp., em ambos os casos a partir de tecido pulmonar.

Jacobson *et al.* (1992), em um estudo realizado com 12 serpentes (a maioria *Crotalus*) com lesões pulmonares compatíveis com infecção por Paramyxovirus isolaram de culturas de pulmão, principalmente: *Morganella morganii*, *Pseudomonas* spp. e *Salmonella arizonae*.

Desse modo, podemos sugerir a possibilidade de que a pneumonia descrita em infecções por nematódeos do gênero *Rhabdias*, possa ser causada não pelo helminto, mas por agentes bacterianos que cresceriam no parênquima pulmonar, talvez em decorrência de imunossupressão causada pela sua presença no pulmão.

## 5. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi analisar as implicações da presença de nematódeos do gênero *Rhabdias* no pulmão de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Para tanto, foi avaliado:

- 1) A morfologia de pulmões de serpentes parasitadas e não-parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*;
- 2) A presença de agentes bacterianos nos pulmões de serpentes parasitadas e não-parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*;
- 3) Os valores hematológicos das serpentes parasitadas e não-parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Seleção dos Animais.

Foram estudadas 12 serpentes da espécie *C. d. terrificus*, recém-capturadas da natureza e doadas ao CEVAP/UNESP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos) de Botucatu. Todos os animais que fizeram parte deste estudo foram prontamente identificados e os dados referentes aos mesmos foram anotados em protocolos individuais (Tabela 1). Foram coletadas amostras de fezes de 38 animais para realização de exame coproparasitológico com a finalidade de se determinar as serpentes parasitadas e não-parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*. As serpentes escolhidas eram imediatamente levadas ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências e imediatamente eutanasiadas.

**Tabela 1.** Procedência, data da coleta, sexo e informações sobre parasitismo das serpentes *Crotalus durissus terrificus* incluídas no estudo.

Animal	Procedência	Data da coleta	Sexo	Parasitismo
1	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	01/06/2003	F	-
2	Fazenda Nova América, Botucatu, SP	08/08/2003	M	+
3	Fazenda São João, Santa Maria da Serra, SP	02/09/2003	M	-
4	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	12/09/2003	M	-
5	Sítio Boa Vista, Botucatu, SP	??/09/2003	M	-
6	Sítio Rio Novo, Águas de Santa Bárbara, SP	29/09/2003	M	-
7	Loteamento Ninho Verde II, Pardinho, SP	14/12/2003	M	+
8	Fazenda e Haras Braido, Cerqueira César	31/03/2004	F	+
9	Condomínio Tamanduá, Santa Maria da Serra, SP	27/03/2004	F	+
10	Pirambóia, SP	27/03/2004	M	+
11	Santa Maria da Serra, SP	07/05/2004	M	+
12	Fazenda São Pedro, Pardinho, SP	14/06/2004	F	-

## 6.2. Coleta das Amostras.

As serpentes escolhidas para o estudo (6 parasitadas e 6 não-parasitadas) foram eutanasiadas mediante injeção contendo anestésico. Foram utilizados cerca de 100 a 150 mg de tiopental sódico (Tiopenthax®), via intramuscular. Dos animais eutanasiados, foram colhidos o pulmão para estudo histológico e microbiológico e sangue para exame hematológico.

## 6.3. Análise parasitológica das fezes.

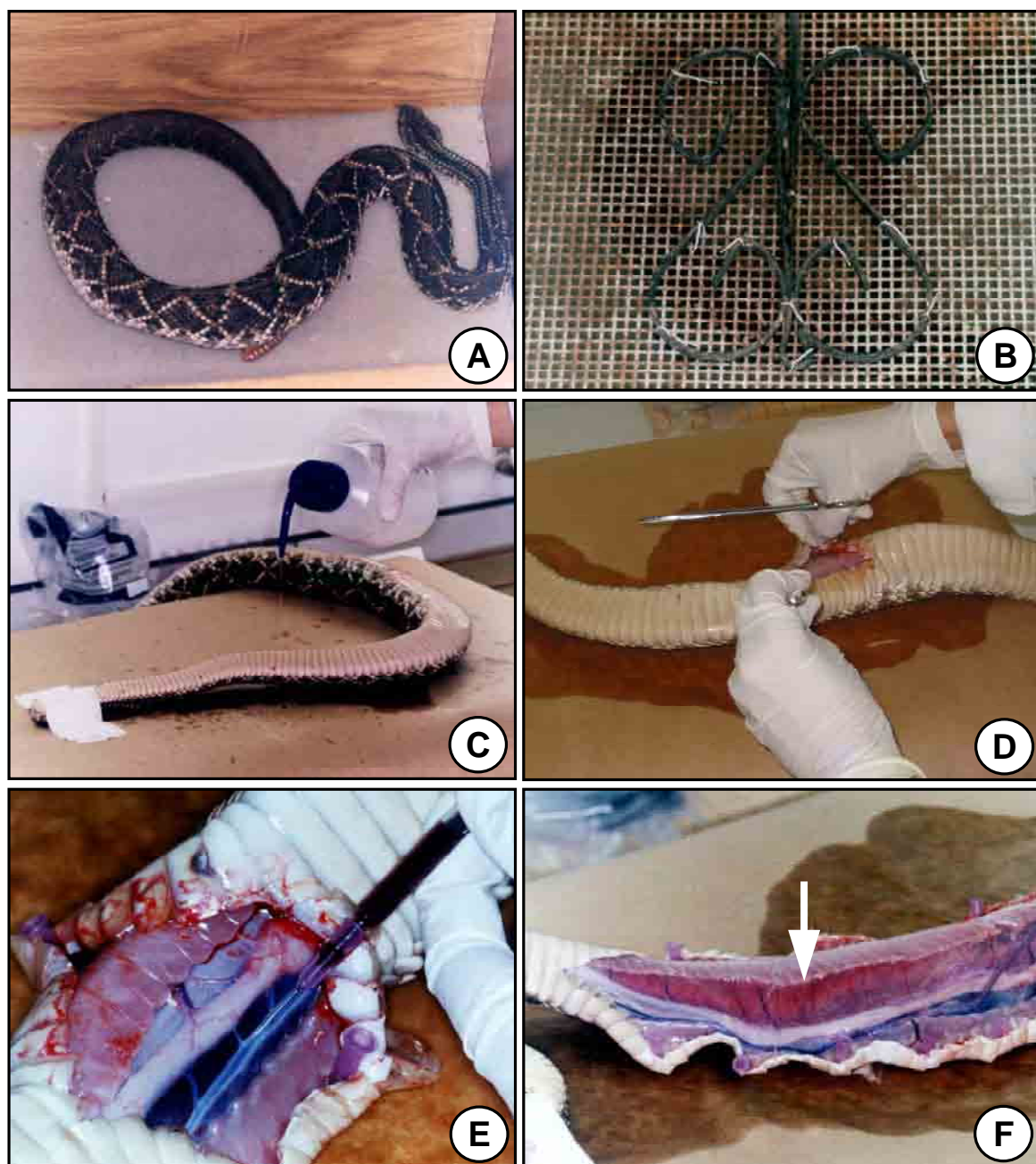
Para a determinação de animais parasitados ou não parasitados por nematódeos do gênero *Rhabdias* foram realizados exames coproparasitológicos nas serpentes recebidas no CEVAP/UNESP. Foram consideradas como parasitadas as serpentes que apresentaram nas fezes os ovos larvados que são característicos da família Rhabdiasidae (Klingenberg, 1993). Nesta família os helmintos dos gêneros *Rhabdias* e *Strongyloides* apresentam ovos semelhantes. Para diferenciação desses ovos, os mesmos eram mensurados em sistema de análise de imagens e considerados ovos de *Rhabdias* aqueles com comprimento de 71,2 a 95,9 µm e largura de 35,1 a 48,6 µm. Para o exame coproparasitológico foram realizados os Métodos de Willis-Molley (método da flutuação), e a Técnica Sedimentação Simples (Hoffman, 1987).

## 6.4. Fixação e análise morfológica dos helmintos pulmonares obtidos nos lavados traqueopulmonares

Os helmintos obtidos após a necropsia dos animais foram coletados e fixados com solução de AFA aquecido. Para o estudo da morfologia os nematódeos foram clarificados em solução de lactofenol de Amann (2,26 mol/L de fenol, 2,68 mol/L de ácido láctico, 5,46 mol/L de glicerina) (Rey, 2001), até a obtenção de boa visualização das estruturas internas de valor sistemático. A morfometria foi realizada em sistema computadorizado de análise de imagens Qwin Lite 2.5 (Leica). Para a identificação da espécie foram utilizados os trabalhos de Vicente *et al.* (1993) e Pereira (1927, 1928).

### **6.5. Exame histopatológico do pulmão.**

Para o exame histopatológico, amostras de pulmão e traquéia foram coletadas da forma asséptica e fixadas em formalina 10%. Após a fixação, essas amostras foram incluídas em historesina (2-hidroxietil-metacrilato, Leica) e submetidas a cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo RM-2165 (Leica). Os cortes histológicos foram corados com HE (hematoxilina e eosina). O infiltrado de células granulocíticas foi quantificado nas lâminas de histopatologia dos animais parasitados e não parasitados e para isso foram contadas as células granulocíticas presentes em 10 campos de 0,3  $\text{mm}^2$  em cada lâmina. O material preparado foi analisado em sistema computadorizado de análise de imagens (Lite Qwin 2.5 – Leica), sendo realizada no final da contagem uma média dos valores encontrados nos animais parasitados e não parasitados, para a comparação entre os grupos.



**Figura 3.** A) Caixa de contenção para aplicação do anestésico; B) Grade por onde era injetado o anestésico; C) Anti-sepsia do local de abertura da cavidade celomática da serpente; D) Abertura da cavidade celomática para coleta de sangue na veia cava; E) Retirada de sangue da veia cava; F) Exposição do pulmão (seta), para sua retirada.



## 6.6. Exame microbiológico do pulmão.

Para a avaliação microbiológica, fragmentos de pulmão foram coletados e colocados individualmente em solução salina, na razão de 10% do volume total e então eram homogeneizados. Com esse material foi realizada pesquisa de bacilos Gram-negativos (Enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.). As amostras foram semeadas em meios seletivos para *Pseudomonas* (Agar cetrimide - OXOID), para *Aeromonas* (Agar Amido Ampicilina), e para enterobactérias (Xilose lisina desoxicolato e McConkey), que foram incubadas a 30°C por 24 horas. Após esse período, as colônias características foram repicadas para um tubo contendo ágar tripticase soja (TSA), que foi incubado a 30 °C por 24 horas. A partir desse crescimento, as cepas foram testadas quanto à produção de oxidase, semeados em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) e os tubos foram incubados a 30 °C por 24 horas. A partir dos resultados desse teste bioquímico, as cepas foram identificadas com a utilização de um Kit para a identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos gram-negativos (API 20 E) e Kit para identificação dos bacilos Gram negativos não enterobactérias não fermentadoras (API 20 NE).

Paralelamente, no momento da coleta, outros fragmentos do pulmão foram colocados em tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI), que foram incubados a 30 °C por 24 horas. Após esse período, se ocorresse turvação do meio, semeava-se os ágars específicos já citados. Se a turvação não ocorresse, os tubos eram descartados e a amostra era considerada negativa.



**Figura 4.** A) Pulmão colocado em placa de Petri estéril para microbiologia; B) Fragmentos de pulmão colocados em solução salina (setas amarelas) e BHI (caldo infusão de cérebro e coração) (setas brancas); C) Amostras sendo semeadas em meios seletivos; D) Ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI); E) e F) Kits utilizados para identificação das bactérias, API 20 E (para enterobactérias e *Aeromonas*) e API 20 NE (para bastonetes Gram-negativos não fermentadores).

### **6.7. Exame hematológico.**

Após a eutanásia e abertura da cavidade celomática, o sangue foi obtido diretamente da veia cava. Foi coletado um volume aproximado de 0,5 ml em seringas de insulina umedecidas com anticoagulante EDTA a 3% diluído em solução fisiológica. Foi realizada a contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer utilizando o diluente de Azul de Toluidina a 0,01% em salina fisiológica. A correção para os trombócitos, foi baseada no diferencial de 200 células. A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina (Feldman *et al.*, 2000; Raskin, 2000), centrifugando-se a solução de células lisadas durante dois a três minutos, antes de se proceder a leitura colorimétrica. O volume globular foi determinado através do método do microhematócrito centrifugando o sangue a 12.000 rpm durante 5 minutos. A contagem diferencial de leucócitos foi efetuada através de esfregaços corados com Giemsa. A determinação da proteína total foi realizada através da refratometria (Jain, 1986).

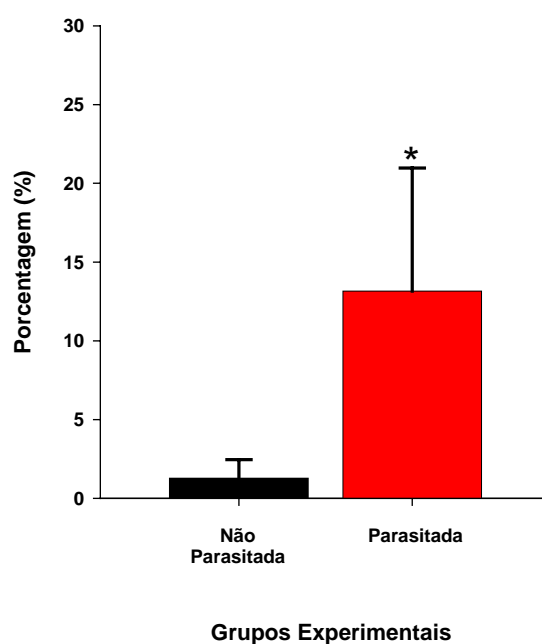
### **6.8. Análise estatística.**

Os dados de hematimetria de animais parasitados e não parasitados foram comparados pelo teste t student. Os dados de leucometria foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A comparação entre a proporção de serpentes com crescimento bacteriano pulmonar nos animais parasitados e não parasitados foi realizada pelo z-test. A média da contagem dos campos dos heterófilos foi analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi de 5%. Toda a análise estatística foi realizada no softw

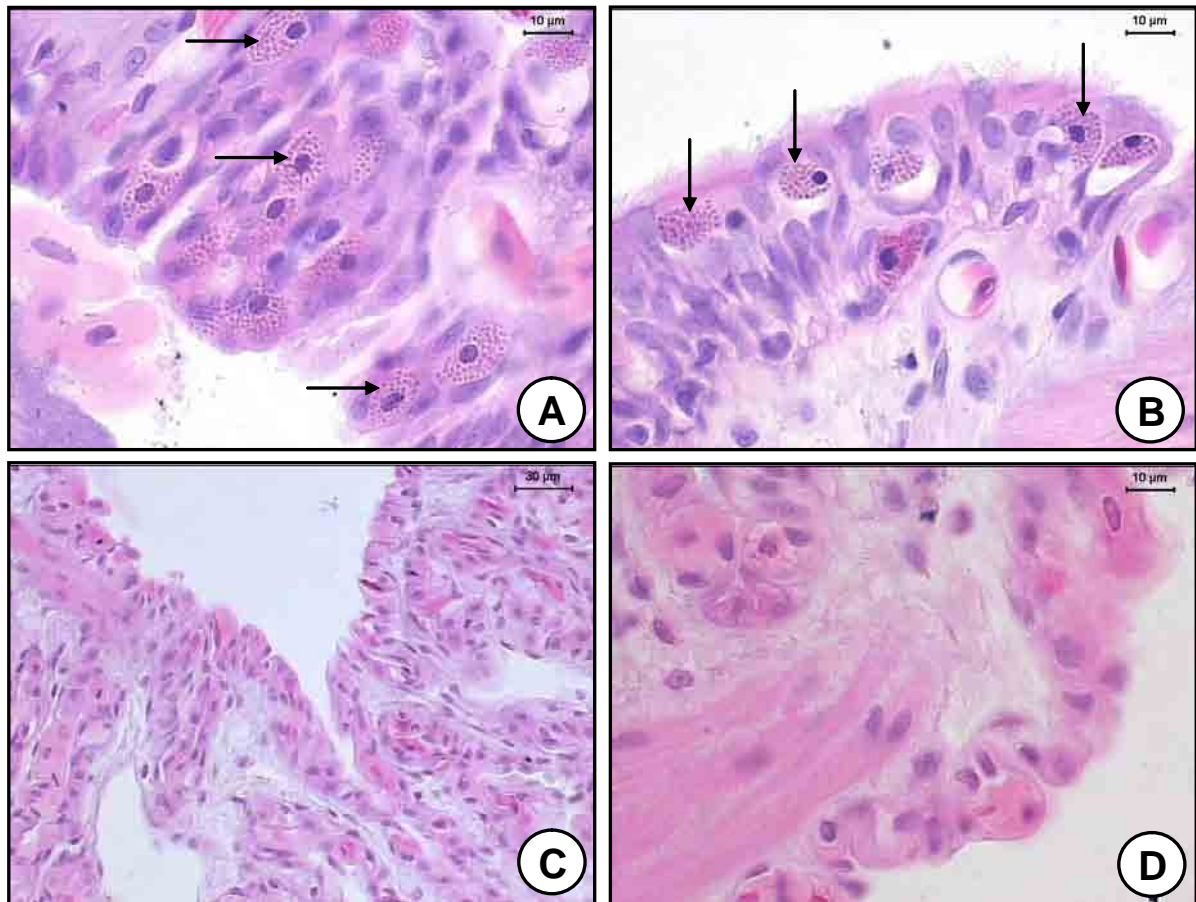
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Avaliação histopatológica das amostras de pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

A avaliação histopatológica das amostras de pulmões de serpentes parasitadas mostrou a presença de células granulocíticas e mononuclear (Figuras 5<sub>A-B</sub>). Essas alterações também foram observadas em alguns animais não parasitados, mas em menor grau. A média da contagem das células granulocíticas realizadas no pulmão das serpentes parasitadas e não parasitadas foi de 13,15 e 1,28, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 4). Em apenas um animal não parasitado não foi encontrado nenhum tipo celular granulocítico acidofílico e nem mononuclear (Figuras 5<sub>C-D</sub>).



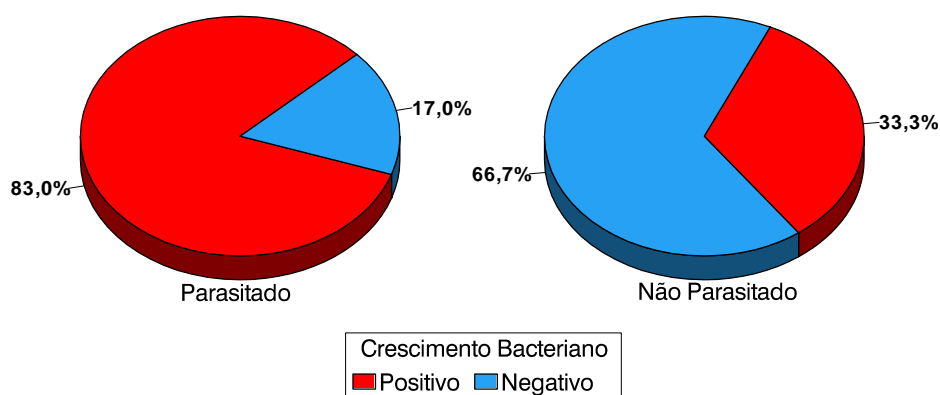
**Figura 5.** Média da contagem de células granulocíticas, em cortes histológicos de pulmão das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas (\*  $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Avaliação histopatológica das amostras de pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*: A) e B) Epitélio e parênquima pulmonar de animal parasitado, apresentando grande quantidade de infiltrado de células granulocíticas (setas); C) e D) epitélio e parênquima pulmonar de animal não parasitado. H.E.

## 7.2. Avaliação microbiológica dos pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

A avaliação microbiológica dos pulmões das serpentes *C. d. terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias* mostrou que, entre todos os animais parasitados, apenas um não apresentou crescimento bacteriano nas provas microbiológicas realizadas. Isso representa 83% de positividade no crescimento de colônias de bactérias. Por outro lado, nos animais não parasitados, o crescimento bacteriano foi detectado em duas serpentes, o que corresponde a 33% de positividade (Figura 6). A análise estatística mostrou que não há diferença significativa entre a proporção de crescimento bacteriano no pulmão de animais parasitados e não parasitados ( $p = 0,242$ ).



**Figura 7.** Porcentagem de crescimento de colônias de bactérias dos pulmões das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Dentre as cinco serpentes que apresentaram crescimento bacteriano, foram identificadas nove espécies de bactérias. Por outro lado, nas duas serpentes não parasitadas, foram identificadas apenas três espécies de bactérias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Espécies de bactérias identificadas em amostras de pulmões de serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Animal	Parasitado	Animal	Não Parasitado
2	<i>Citrobacter divergens</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7	Resultado negativo	3	Resultado negativo
8	<i>Proteus vulgaris</i>	4	Resultado negativo
9	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Pantoea</i> spp.	5	Resultado negativo
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pantoea</i> spp.	6	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
11	<i>Providencia rettgeri</i> <i>Proteus vulgaris</i>	12	Resultado negativo

### 7.3. Hematologia das serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

A análise hematimétrica das serpentes parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias* mostrou que nos animais parasitados houve aumento da concentração de proteína plasmática ( $p = 0,011$ ), quando comparado com os animais não parasitados. Para as demais variáveis, não foi detectada diferença significativa entre os animais parasitados e não parasitados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Avaliação hematómica de serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Animal	Hemácias (N/ $\mu$ l)	Trombócitos (N/ $\mu$ l)	Hemoglobina (g/dl)	VG (%)	Proteína Plasmática (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (%)
<i>Não parasitados</i>							
1	625.000	12.269	9,5	34	3,0	54,8	27,9
3	565.000	13.938	8,3	29	3,8	51,8	28,6
4	552.500	12.640	10	32	3,2	58,2	31,3
5	400.000	15.000	8,3	27	3,2	67,5	30,7
6	355.000	10.634	7,4	29	4,4	81,6	25,8
12	525.000	13.920	9,5	27	4,4	51,4	35,2
<b>Média</b>	<b>503.750</b>	<b>13.066</b>	<b>8,8</b>	<b>30</b>	<b>3,7</b>	<b>60,8</b>	<b>30,0</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>104.088</b>	<b>1.547</b>	<b>0,9</b>	<b>2,8</b>	<b>0,6</b>	<b>11,7</b>	<b>3,2</b>
<i>Parasitados</i>							
2	485.000	4331	8,5	32	4,3	68,7	26,1
7	475.000	17750	7,6	26	4,6	54,7	29,2
8	375.000	4187	6,4	21	4,6	56,0	30,4
9	475.000	9056	8,5	30	4,8	63,1	28,3
10	352.500	17250	7,9	26	4,6	73,8	30,3
11	320.000	17000	8,3	22	4,2	68,7	37,7
<b>Média</b>	<b>413.750</b>	<b>11.596</b>	<b>7,8</b>	<b>26</b>	<b>4,5</b>	<b>64,1</b>	<b>30,0</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>72.968</b>	<b>6.529</b>	<b>0,8</b>	<b>4,3</b>	<b>0,2</b>	<b>7,6</b>	<b>3,9</b>

**Legenda:** VG – volume globular, VCM – Volume Corpuscular Médio, CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

A avaliação leucométrica das serpentes parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias* mostrou que nos animais parasitados houve diminuição do número de linfócitos circulantes ( $p = 0,009$ ) em relação aos animais não parasitados. Para as demais variáveis, não foi detectada diferença significativa entre os animais parasitados e não parasitados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).



**Tabela 4.** Avaliação leucométrica de serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Animal	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Heterófilos	Basófilos	Eosinófilos	Azurófilos
<i>Não parasitados</i>							
1	6.606	1.981,8	66,1	3038,8	462,4	132,1	924,8
3	8.186	5.730,0	81,9	818,6	491,2	409,3	654,
4	7.110	4.450,4	142,2	1493,1	284,4	142,2	497,7
5	3.750	2.437,5	300,0	187,5	262,5	262,5	300
6	11.992	8.633,7	239,9	2038,5	0	120,0	959,3
12	10.080	4.637,0	504,0	806,0	0	0	4133,0
<b>Mediana</b>	<b>7.648</b>	<b>4.543,7</b>	<b>191,0</b>	<b>1.155,9</b>	<b>273,4</b>	<b>137,1</b>	<b>789,8</b>
<b>ASIQ</b>	<b>1.737</b>	<b>1.646,5</b>	<b>109,5</b>	<b>616,3</b>	<b>231,2</b>	<b>71,3</b>	<b>230,8</b>
<i>Parasitados</i>							
2	3.150	913,5	0	1228,52	0	220,5	787,5
7	9.053	3.892,6	0	1720,0	0	271,6	3168,4
8	12.563	879,3	1381,9	8416,8	0	376,8	1507,5
9	3.351	1.105,8	0	1340,3	0	0	904,7
10	4.485	897,0	0	1524,9	179,4	0	1883,7
11	3.230	871,1	323	775,2	0	0	1550,4
<b>Mediana</b>	<b>3.918</b>	<b>905,3</b>	<b>0</b>	<b>1.432,6</b>	<b>0</b>	<b>110,2</b>	<b>1.528,9</b>
<b>ASIQ</b>	<b>2.912</b>	<b>113,3</b>	<b>161,5</b>	<b>246,0</b>	<b>0</b>	<b>135,8</b>	<b>489,5</b>

**Legenda:** ASIQ – amplitude semi-interquartilica.

## 8. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos as implicações da presença de nematódeos do gênero *Rhabdias* no pulmão de serpentes *C. d. terrificus*, através de análise histopatológica e microbiológica de pulmão e hematologia de serpentes parasitadas e não parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Em relação à análise histopatológica, observamos que quando as serpentes estavam parasitadas havia no tecido pulmonar um infiltrado do tipo acidofílico granulocítico, e de células monucleares. Essas alterações foram observadas em maior quantidade em pulmão de animais parasitados.

O termo acidofílico pode ser utilizado tanto para heterófilos como para eosinófilos. Em Chelonia e Crocodilia há descrição de dois tipos de granulócitos acidófilos, que são designados como uma variante de uma única linhagem de célula (Girons, 1970 *apud* Montali, 1988), e foram referidos como eosinófilos tipo I (ou heterófilos) e tipo II (ou eosinófilos) (Pienaar, 1962 *apud* Montali, 1988). Porém, fortes evidências separaram heterófilos e eosinófilos como sendo de linhagens de células diferentes (Mateo *et al.*, 1984). Em Squamata, serpentes e lagartos, na avaliação histopatológica são relatados apenas um tipo de granulócito acidofílico (Montali, 1988). Mas alguns autores têm demonstrado a presença de eosinófilos em serpentes (Feldman *et al.*, 2000; Salakji *et al.*, 2002; Thrall *et al.*, 2004).

São escassos na literatura trabalhos que avaliem a histopatologia de pulmão de serpentes acometidas por helmintoses. Nesse sentido encontramos o trabalho de Grego (2000), que estudou alterações patológicas em pulmão de serpentes *B. jararaca* acometidas por *Rhabdias vellardi*. Nesse trabalho, é relatado a ocorrência de pneumonia intersticial, congestão, edema e exsudação hemorrágica.

Samora (1993) relatou enterite parasitária aguda, causada pelo *R. vellardi*, em *B. moojeni*. Kolesnikovas (1997) estudou serpentes provenientes do serpentário externo aberto do Instituto Butantan e verificou que 53% das serpentes *C. d. terrificus* infectadas por *R. vellardi*, apresentaram pneumonia.

Klingenberg (2000), relatou que a pneumonia em serpentes é caracterizada por abertura da boca, dificuldade respiratória e expulsão de exsudato pela traquéia. Também citou que alguns répteis têm secreção oral abundante, sendo esta de origem pulmonar.

Todos estes estudos mostraram algum tipo de alteração associada à presença de nematódeos do gênero *Rhabdias*. Esses achados confirmam as observações realizadas no presente trabalho. Entretanto, em nenhum dos estudos da literatura há menção de presença de infiltrado heterofílico e mononuclear em pulmão de serpentes infectadas por *Rhabdias*. Estes infiltrados heterofílicos e monocuclear foram observados em serpentes da espécie *Boa constrictor constrictor* num estudo experimental induzindo inflamação, implantando lamínulas em tecido subcutâneo (Tucunduva *et al.*, 2001). O *Rhabdias* spp. pode estar causando uma inflamação nos tecidos, por isso levando a presença de infiltrados granulocíticos e mononuclear corroborando com o trabalho de Tucunduva.

Em mamíferos as células freqüentemente encontradas em infiltrados inflamatórios de animais parasitados por helmintos são os eosinófilos; estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que linfócitos T e macrófagos regulam a produção de eosinófilos. Uma acelerada produção e lançamento de eosinófilos da medula óssea para o sangue ocorre em infecções por parasitas. Além disso, é descrito em literatura que estas células têm importante papel no controle de infecções por parasitos metazoários (Jain, 1993; Amarante *et al.*, 1999).

Segundo Montali (1998), embora diferenças bioquímicas existam, os heterófilos de répteis parecem ser funcionalmente homólogos aos neutrófilos de mamíferos. A função primária dos heterófilos é fagocitose, por isso um significativo aumento na contagem usualmente está associada a doenças inflamatórias, especialmente aquelas envolvendo agentes microbianos, infecções parasitárias ou injúrias teciduais (Feldman *et al.*, 2000; Thrall *et al.*, 2004). Além disso, essas células têm importante função também nos processos de quimiotaxia, aderência, atividade microbiana, entre outras (Jain, 1993).

Os pulmões de serpentes parasitadas e não parasitadas, por nematódeos do gênero *Rhabdias*, foram avaliados quanto a associação com crescimento bacteriano pulmonar.

Os nematódeos do gênero *Rhabdias* apresentam uma fase de vida livre. Os ovos resultantes da postura da fêmea parasita saem junto com as fezes do animal e vão para o ambiente. Em condições ideais, os ovos eclodem dando origem à larva rabditóide L1, que evolui para larva L2, também rabditóide. Após algum tempo, dão origem à larva L3, filarióide, que é a forma infectante para as serpentes. A infecção pode ocorrer via transcutânea ou oral (Klingenberg, 1993; Cheng, 1986, Anderson, 2000). As larvas rabditóides alimentam-se ativamente no ambiente. Sua alimentação consiste basicamente de microorganismos e matéria orgânica. Por outro lado, as larvas filarióides não se alimentam no ambiente (Cheng, 1986). Segundo Marcus (1971) e Fowler (1986), existe constante eliminação de bactérias nas fezes, estando estas presentes no meio ambiente e em equilíbrio com os animais. Portanto, como as larvas rabditóides se alimentam no ambiente, provavelmente elas se contaminam com uma ampla variedade de agentes microbianos. Ao chegarem no pulmão, seja por via oral ou transcutânea, essas larvas podem eliminar os microorganismos adquiridos no ambiente como outros microorganismos adquiridos ao longo do seu ciclo no hospedeiro, e com isso, a “pneumonia verminótica” citada por Klingenberg (1993), poderia ser causada não pelo verme, mas sim pelos microorganismos associados a ele, ou por ambos. Marcus (1971) e Fowler (1986) ainda acreditam que para que bactérias oportunistas venham causar lesões, precisam de fatores que promovam um desequilíbrio nesta relação. É possível supor que o parasita estaria debilitando o animal e levando consigo as bactérias oportunistas, estas poderiam estar causando a “pneumonia verminótica”.

Corroborando essa hipótese, nossos achados microbiológicos demonstraram que 83% das serpentes parasitadas apresentaram crescimento bacteriano no pulmão enquanto que as não parasitadas que apresentaram apenas 33%. A diversidade de espécies de bactérias isoladas nas serpentes parasitadas foi também maior do que nas serpentes não parasitadas. A estatística comparando os animais parasitados e não parasitados quanto aos achados microbiológicos não foi significativa devido ao

número de animais utilizados nesse trabalho, porém, se o dobro do número de animais tivesse sido utilizado e a proporção dos achados microbiológicos se mantivessem, esta diferença seria significativa.

Dados semelhantes foram obtidos por Nogueira (2004) que, trabalhando com paramixovírus ofídico e pulmão de serpentes *C. d. terrificus*, encontrou em uma amostra de 50 serpentes, 44% de infecção por *Rhabdias* sp. e uma estreita relação entre a presença do nematódeo pulmonar e crescimento bacteriano neste órgão. Esta autora ainda apresenta, como uma das suas conclusões, que os nematódeos pulmonares do gênero *Rhabdias* podem estar envolvidos na complicação dos quadros bacterianos apresentados pelas serpentes estudadas.

As bactérias mais freqüentemente isoladas dos pulmões das serpentes da espécie *C. d. terrificus*, no presente estudo, foram as Gram-negativas *Pantoea* spp., *B. cepacia* e *P. vulgaris*. Cada uma dessas espécies foi encontrada em pelo menos duas serpentes. Outras bactérias isoladas foram: *E. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. fluorescens*, *P. rettigeri* e *A. baumani*.

O gênero *Pantoea* constitui um grupo de bacilos aeróbicos Gram-negativos freqüentemente isolados de solo, água, plantas, sementes, vegetais, alimento, animais e humanos. As infecções em humanos e outros animais ocorrem especialmente em indivíduos debilitados. Este fato foi demonstrado por Larangeira *et al.* (2002) que analisaram a microbiota vaginal de bactérias gram-negativas em micos-leões (*Leontopithecus* sp.) mantidos em cativeiro, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, e encontraram *P. agglomerans* em 21,2% dos animais. Entretanto, apesar de alguns casos de infecções em humanos e animais serem descritos na literatura, as bactérias desse gênero estão mais associadas a solo e afecções de plantas (Asis & Adachi, 2003; Manulis & Barash, 2003). Esse aspecto reforça a hipótese de que os nematódeos do gênero *Rhabdias* podem carrear bactérias do ambiente para o pulmão de serpentes e estas poderiam provocar alterações patológicas nesse órgão, como discutido anteriormente.

Estudos anteriores descreveram o isolamento de bactérias em serpentes *C. d. terrificus*. Moreno *et al.* (1973), isolou 7 espécies de bactérias de conteúdo fecal. Esse

estudo foi realizado com 119 amostras de fezes de *C. d. terrificus* e outras espécies de serpentes. Nas serpentes *C. d. terrificus* foi encontrado um índice de positividade de 11,8% (14 serpentes positivas para enterobactérias). Neste estudo a flora predominante fez-se representar por *Citrobacter* (35%), seguida de *Proteus vulgaris* (16,4%), *Proteus morgani* (14,4%) e *Proteus rettgeri* (13,0%).

Cambre *et al.* (1980) estudaram 317 répteis e encontraram 117 animais positivos para um ou mais sorotipos de *Salmonella* ou *Arizona*. No seu estudo, 125 serpentes foram analisados (70 espécies da família Boidae, 48 da Colubridae e 7 da Viperidae), e dentre estas 69 estavam positivas para uma dessas bactérias. Em culturas de fígado e trato gastrointestinal havia uma associação com outras bactérias como: *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter freundii*.

Em outro estudo realizado com 310 serpentes (141 *Boa* spp. e 169 *Python* spp.) foram encontradas bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Pseudomonas* (Cooper, 2000). Jacobson *et al.* (1992) estudando serpentes com Paramixovirus, isolou através de exame microbiológico de pulmão de 12 serpentes as seguintes bactérias: *A. calcoaceticus*, *C. freundii*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *M. morgani*, *Proteus* sp., *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas moltophilia*, *Salmonella arizonae*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Streptococcus faecium*. Coutinho *et al.* (2001) relata o isolamento de *Proteus vulgaris* de fígado, pele e rim, em serpentes *Helicops modestus* no Brasil, com uma taxa de mortalidade de 100%. No presente estudo, isolamos bactérias semelhantes as dos estudos relatados acima.

Nogueira (2004) realizou análise microbiológica de lavado traqueopulmonar de 51 serpentes *C. d. terrificus* e encontrou uma diversidade muito grande de bactérias, dentre estas foram isolados gêneros semelhantes aos isolados no presente estudo como: *Pantoea* sp. (= *Enterobacter agglomerans*), *Citrobacter* sp. *Enterobacter* sp., *Providencia* sp. e a única espécie encontrada em ambos os trabalhos foi *Proteus vulgaris*. Apesar do grande número de serpentes estudado por Nogueira (2004), não foi detectado no seu estudo a ocorrência de *Burkholderia cepacea*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii*, como demonstramos no presente trabalho. Nogueira (2004) ressalta que, no seu estudo, grande parte dos agentes encontrados pode ter sido carregada da cavidade oral através da sonda que era introduzida para realização do lavado traqueopulmonar. Neste estudo não foi realizado lavado traqueopulmonar, o que exclui a contaminação com bactérias da cavidade oral. Apesar disso, esses dados demonstram a grande diversidade de microorganismos que podem ser isolados de pulmão de serpentes.

Estudos com outras espécies de serpentes também têm sido publicados. Hilf *et al.* (1990), trabalhando com cultura de bactérias de pulmão de serpentes da família Boidae, demonstraram que o bacilo Gram-negativo mais comumente isolado foi *P. rettgeri* e que, em serpentes com pneumonia, o número de bacilos Gram-negativos foi significativamente maior que em serpentes normais. De duas serpentes que vieram a óbito em consequência de pneumonia, de uma isolou-se maciçamente *A. hydrophila* e da segunda *Salmonella* sp., *Citrobacter* sp. e *Enterococcus* sp., em ambos os casos a partir de tecido pulmonar. Desses agentes somente *Citrobacter* foi encontrado em nosso estudo.

Marcus (1971) relatou a ocorrência de pneumonia em serpentes com *A. hydrophila*. O mesmo autor (Marcus, 1981) relatou em outro trabalho que em infecções por *R. vellardi* o pulmão das serpentes mostrou nenhum ou poucos sinais clínicos, além de resposta inflamatória mínima.

Desse modo, verificamos que as serpentes parasitadas podem apresentar diferentes espécies de bactérias em associação com os nematódeos do gênero *Rhabdias* e junto com os vermes, estas bactérias podem causar alterações patológicas no tecido pulmonar. Além disso, verificamos que existe uma grande diversidade de bactérias que podem acometer o pulmão de *C. d. terrificus*.

Os dados hematológicos tiveram pouca alteração quando consideramos os animais parasitados e não parasitados. Somente a concentração de proteínas plasmática e a quantidade de linfócitos forneceram valores estatisticamente significativos.

Nos animais parasitados observamos aumento nos valores de proteína plasmática, que ocorre nos casos de hemoconcentração (desidratação) ou número elevado de imunoglobulinas, associada com doença inflamatória crônica (Mader, 1996). É possível sugerir que a presença de *Rhabdias* spp. em pulmão de serpentes possa levar a quadros de doença inflamatória crônica e com isso induzir aumento da proteína plasmática. A eletroforese seria uma ferramenta para ajudar na avaliação de répteis com hiperglobulinemia. As frações alfa, beta e gamaglobulinas, podem aumentar em doenças infecciosas (Mader, 1996).

Também verificamos uma linfopenia nas serpentes parasitadas. Esta alteração freqüentemente está associada a uma má nutrição ou a doenças secundárias devido ao estresse ou imunossupressão (Thrall *et al.*, 2004) ou em certas infecções parasitárias (Feldman *et al.*, 2000). Sendo assim, podemos sugerir que a linfopenia observada nos animais parasitados possa estar associada à presença de *Rhabdias* spp.

O aumento da proteína plasmática foi verificado quando comparamos o grupo de serpentes parasitadas com o de não parasitadas, pelo teste estatístico, porém, segundo os critérios de Feldman *et al.* (2000) e Raskin (2000), todos os animais estão dentro dos parâmetros normais. Para os linfócitos, verificamos uma linfopenia em 5 das 6 serpentes parasitadas e em 2 serpentes não parasitadas. As hemácias também se apresentaram abaixo dos valores normais nos animais parasitados e nos animais de números 5 e 6 (não parasitados), o que sugere uma anemia normocítica normocrômica (Raskin, 2000).

Individualmente, ainda segundo Feldman *et al.* (2000) e Raskin (2000), os animais 1 (não parasitado) e 8 (parasitado) apresentaram heterofilia. O aumento na contagem de heterófilos usualmente está associado a doenças inflamatórias, especialmente aquelas envolvendo agentes bacterianos, infecções parasitárias ou injúrias teciduais. Em condições não inflamatórias, podem estar associados a estresse, neoplasia ou leucemia heterofílica (Thrall *et al.*, 2004; Mader, 1996). Os animais 10, 11 (parasitados) e 12 (não parasitado) apresentaram azurofilia. A contagem aumentada desses monócitos azurofílicos indica uma estimulação antigênica e doenças infecciosas (Feldman *et al.*, 2000).



Desse modo, podemos sugerir que a presença de *Rhabdias* spp. pode estar associada, de forma discreta, com alterações dos parâmetros hematológicos do hospedeiro. Entretanto, os dados hematológicos de répteis devem ser analisados com cautela, pois, como afirmam Mader (2000) e Thrall *et al.* (2004), fatores externos, como por exemplo, variações ambientais, podem inibir ou intensificar a resposta do animal a uma doença e, portanto, não devem ser menosprezados. Ainda segundo estes autores, as respostas celulares no sangue dos répteis são menos previsíveis do que aquelas no sangue dos mamíferos e aves, cujos microambientes celulares são mais estáveis.

Ainda, segundo Feldman *et al.* (2000) e Raskin (2000), os valores obtidos em nosso estudo estão em sua maioria dentro da faixa de normalidade para serpentes. Porém, dois aspectos devem ser considerados com relação a hematologia: 1) os valores normais citados por Feldman *et al.* (2000) e Raskin (2000) não levaram em conta a presença de uma parasitose, 2) a hematologia não foi realizada com a mesma espécie de serpente estudada no presente projeto.

## 9. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia proposta e a forma de análise empregada, verificamos que serpentes *Crotalus durissus terrificus* parasitadas com nematódeos do gênero *Rhabdias* apresentam:

1. Infiltrado de células granulocíticas e mononucleares nos pulmões;
2. Aumento de crescimento bacteriano nos pulmões;
3. Pouca alteração no perfil hematológico.

Sendo assim, podemos concluir que os nematódeos do gênero *Rhabdias* constituem importante problema de saúde para as serpentes e, portanto, todo animal introduzido em cativeiro deve ser tratado para eliminação destes parasitas.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F.W. Nematode burdens and cellular responses in the abomal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbreed lambs. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 311-324, 1999.

ANDERSON, R.C. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2000. 672p.

ARAÚJO, T.; MORO, L; LÚCIA, M; GOLLOUBEFF, B; VASCONCELOS, A.C. Ocorrência de alguns endo e ectoparasitos no serpentário da UNIFENAS - Universidade de Alfenas - MG . **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, p. 19-22. 1999.

ARTIGAS, P.; ARAUJO.P.; GRAEIRO, A. Redescricao de *Acanthorhabdias acanthorhabdias* Pereira, 1927 . **Arq. Inst. Biol.**, v. 40, p. 33-37, 1973.

ASIS, C.A, JR.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.38, p.19–23, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidente crotálico. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p.161-167, 1992.

BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J. Digenetic trematodes infection in a *Bothrops moojeni* (Viperidae) population from a fauna rescue in Porto Primavera, São Paulo State. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, n.2, p.243-245, 2003.

BOEVER, W. J.; WILLIAMS, J. *Arizona* septicemia in three *Boa constrictor*. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, v. 70, p.1357-1359, 1975.

---

<sup>1</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.  
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- CALIXTO, S.; BALDASSI, L.; MOULIN, A. A. P.; HIPOLITO, M. *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abscesso em serpente (*Bothrops neuwiedi*). **Rev. Microbiol.**, v.17, p.28-30, 1986.
- CAMBRE, R. C.; GREEN, D. E.; SMITH, E. E.; MONTALI, R. J.; BUSH, M. Salmonellosis and Arizonosis in the reptile collection at the national zoological park. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.177, p.800-803, 1980.
- CHENG, T.C. **General parasitology**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1986.
- COOPER, J. E.; LEAKEY, J. H. E. A septicaemic disease of East African snakes associated with Enterobacteriaceae. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.70, p.80, 1976.
- COOPER, J. E. Reptilian Microbiology. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 2000. p.486.
- COUTINHO, S.D.A., CARVALHO, V.M., RAMOS, M.C.C. *et al.* Bacterial septicemia in water snakes (*Helicops modestus*) in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n.4, p.1-2, 2001.
- ESTERABADI, A. H.; ENTESSAR, F.; KHAN, M. A. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from an outbreak of haemorrhagic septicemia in snakes. **Can. J. Comp. Med.**, v.37, p.418-420, 1973.
- FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FERNANDES, M.P.M.; SOUZA, SV. Redescção de *Acanthorhabdias acanthorhabdias* Pereira, 1927. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 72, p. 291-292, 1974.
- FOWLER, M.E. **Zoo and wild animal medicine**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986.
- GIORGI, R.; BERNARDI, M. M.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.31, p.1257-1265, 1993.

- GREGO, K.F. **Patologia comparada das principais infecções parasitárias acometendo as Serpentes da Espécie *Bothrops jararaca* (Wied,1824)**. 2000. 155f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HESS, J. L.; RUDY, R.L. Ulcerative stomatitis in the Python. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, v. 69, n.11, p.1379-1380, nov. 1974.
- HEYWOOD, R. *Aeromonas* infection in snakes. **Cornell Vet.**, v.58, p.236-241, 1968.
- HILF, M.; WAGNER, R. A.; YU, V. L. A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. **J. Zoo Wildl. Med.**, v.21, p.318-325, 1990.
- HIPOLITO, M.; MAVRIDIS, S. C.; BALDASSI, L.; MOULIN, A. A. P.; BARBOSA, M. L. *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* isolada de caso de estomatite em *Bothrops alternatus* (Serpente, Viperidae). **Rev. Microbiol.**, v.18, p.224-228, 1987.
- HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987. p.33-39.
- IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P. T.; HIGASHI, H.G.; ROLIM ROSA, R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. **Mem. Inst. Butantan**, v. 47/48, p.113-120, 1983/84.
- JACOBSON, E. Diseases of the respiratory system in reptiles. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, p.1169-1170, set. 1978.
- JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; WELLS, S.; BOWLER, B. S.; SCHUMACHER, J. Epizootic of ophidian paramyxovirus in a zoological collection: pathological, microbiological, and serological findings. **J. Zoo Wildl. Med.**, v.23, p.318-327, 1992.
- JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KLINGENBERG, R. J. **Understanding reptiles parasites**. California: Advanced Vivarium Systems, 1993. 83p.

KLINGENBERG, R. J. Reptilian parasite testing. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 2000. p.486.

KLOSS, G. R. Alguns *Rhabdias* (Nematoda) de *Bufo* no Brasil. **Pap. Avulsos. Zool**, v.24, p.1-52, 1971.

KOLESNIKOVAS, C. K. M. **Patologia Comparada de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*, LAURENTI, 1768) mantidos em cativeiro**. 1997. 53f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LARANGEIRA, H.H.S.; SILVEIRA, R.H.; LEMOS, C.K.B.; MORAES, I., A. PISSINATI, A.; CERQUEIRA, A.M.F. **Avaliação da Microbiota vaginal de bactérias Gram negativas em micos-leões (*Leontopithecus* sp. - Callitrichidae - Primates) mantidos em cativeiro no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. In\_\_\_: ENCONTRO CIENTÍFICO DO INSTITUTO BIOMÉDICO. 1ª, 2002, Niterói. **Anais...**Niterói, 2002. p.14.

MADER, D. R. Euthanasia and Necropsy. In: MADER, M. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996. p.277-281.

MADER, D. R. Normal Hematology of Reptiles. In:\_\_\_ FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1126- 1132.

MANULLIS, S; BARASH, I. *Pantoea agglomerans* pvs. Gypsophilae and betae recently evolved pathogens?. **Mol. Plant Pathol.**, v.4, n.5, p.307-314, 2003.

MARCUS, L. C. Infectious diseases of reptiles. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.159, p.1626-1631, 1971.

MARCUS, L. C., **Veterinary biology and medicine of captive amphibians and reptiles**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.114-174, 1981.

- MATEO, M.R.; ROBERTS, E.D.; ENRIGHT, F. M. Morfologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*) **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, p.1046-1053, 1984.
- MATTISON, C. **Rattler!: a natural history of rattlesnakes**. London: Blandford, 1996. 144p.
- MCDOWELL, S. B. Systematics. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. **S. Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan, 1987. p.3-50.
- MONTALI, R. J. Comparative Pathology of Inflammation in the Higher Vertebrates (Reptiles, Birds and Mammals). **J. Comp. Pathol.**, v. 99, p. 1-26, 1988.
- MORENO, G.; LOPES, A.M.; BELLUOMINI, E.; PESSOA, G.V.A; BIASI, P.; ANDRADE, C.R. Enterobactérias Isoladas de Anfíbios e Répteis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.15, n.3, p.122-126, 1973.
- NOGUEIRA, M.F.; BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J.; LOPES, C.A .M; ARAÚJO, JR, J.P. Isolation of ophidian paramyxovirus (OPMV) in captive rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) from Botucatu, São Paulo, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.8, p.168-173, 2002.
- NOGUEIRA, M.F. **Estudo de Paramyxovirus, Mycoplasma e Bacilos Gram-negativos no trato Respiratório de Serpentes *Crotalus durissus terrificus***. 2004. 184f. Tese (Doutorado em Microbiologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ORÓS, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; HERRÁEZ, P.; SANTANA, P.; FERNÁNDEZ, A. Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella arizonae* in two snakes. **J. Comp. Pathol.**, v. 115, p.185-189, 1996.
- ORÓS, J.; RODRIGUEZ, J. L.; MONTEROS, A. E.; RODRÍGUEZ, F.; HERRÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, A. Tracheal malformation in a bicephalic honduran milk snake (*Lampropeltis hondurensis*) and subsequent fatal *Salmonella arizonae* infection. **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 28, p.331-335, 1997.

- PAGE, L. A. Experimental ulcerative stomatitis in king snakes. **Cornell Vet.**, v.51, p.258-266, 1961.
- PEREIRA, C. Fauna Helminthologica dos Ophideos Brasileiros. **Bol. Biol. São Paulo**, v. 10, p.179-185, 1927.
- PEREIRA, C. Fauna Helminthologica dos Ophideos Brasileiros. **Bol. Biol. São Paulo**, v.11, p. 13-22, 1928.
- RASKIN, E.R. Reptilian complete blood count. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 2000. p.486.
- REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856p.
- ROSSI, J.; ROSSI, R. **What's wrong with my snake?** California: The Hepertocultura Libray, 1995. p.113-116.
- SALAKIJ,C.; SALAKIJ, J.; APIBAL,S.; NARKKONG, L. C.; CHANHOME, L.; ROCHANAPAT, N. Hematology, Morfology, Cytochemical Staining.
- SAMORA, C.C.C. Acute parasitic enteritis in Bothrops moojeni Hoge, 1965 Sankes (Viperidae – Crotalinae). **The snake**, v.25, p.131-134, 1993.
- SARTORI FILHO, R.; PRESTES, N. C.; THOMAZINI, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J.; TOSCANO, E.; CANAVESSI, A. M. O.; BARRAVIEIRA, B. Use of fibrin glue derived from snake venom in testicular biopsy of rams. **J.Venom. Anim. Toxins**, v.4, p.23-35, 1998.
- SILVA, R. J.; FECCHIO, D.; BARRAVIEIRA, B. Effect of *Crotallus durissus terrificus* (LAURENTI,1768) venom on the evolution of Ehrlich ascites tumor. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.3, p.324-341, 1997.
- SILVA, R.J. **As serpentes**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 141p.
- SILVA, R.J.; BARELLA, T.H.; NOGUEIRA, M.F.; O'DWYER, L.H. Frequency of Helminths in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in captivity. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.10, n. 2, p. 91-93, 2001.



SILVA, R.J.; SILVA, M.G.; VILELA, L.C.; FECCHIO, D. Antitumor effect of *Bothrops jararaca*. **Mediat. Inflamm.**, v.11, n.2, p. 99-104, 2002a.

SILVA, R.J.; SILVA, M.G.; VILELA, L.C.; FECCHIO, D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with *Bothrops jararaca*. **Mediat. Inflamm.**, v.11, n. 4, p.197-201, 2002 b.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**: reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 138p.

THRALL, M.A., BAKER, D. C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTAMAN, M. J., LASSEN, E. D., REBAR, A., WEISER, G. Hematology of Reptiles. In: \_\_. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Battimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.259-276.

TUCUNDUVA, M.; BORELLI, P.; SILVA, J. R.M.C. Experimental study of induced inflammation in the Brazilian boa (*Boa constrictor constrictor*). **J. Comp. Pathol.**, v. 125, p. 174-181, 2001.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D.C.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil. Parte III: Nematóides de répteis. **Rev. Bras. Zool.**, v.10. p.1-183, 1993.

VIEIRA SANTOS, M.M.; SILVA, R.J.; SILVA, M.G.; FECCHIO, D. Subpopulations of mononuclear leukocytes associated with inhibition of Ehrlich ascites tumor growth by treatment with *Bothrops jararaca* venom. **Mediat. Inflamm.**, v.13, p.29-32, 2004.

WALLACH, J. D., BOEVER, W. J. Reptiles and amphibians. In: \_\_. **Diseases of exotic animals**: medical and surgical management. Philadelphia: W. B. Saunders Company., 1993 p.979-1047.