

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Strongyloides ophidiae (NEMATODA, STRONGYLOIDIDAE)
PARASITAS DE SERPENTES

KARINA RODRIGUES DOS SANTOS

Botucatu – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Strongyloides ophidiae (NEMATODA, STRONGYLOIDIDAE)
PARASITAS DE SERPENTES

KARINA RODRIGUES DOS SANTOS

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo José da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Santos, Karina Rodrigues dos.

Caracterização morfológica e molecular de *Strongyloides ophidiae*
(Nematoda, Strongyloididae) parasitas de serpentes / Karina Rodrigues dos
Santos. – Botucatu [57p], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Reinaldo José da Silva

Assunto CAPES: 50502042

1. Parasitologia veterinária 2. Serpente – Parasitas

CDD 636.089696

Palavras-chave: Serpentes; *Strongyloides ophidiae*

Nome do Autor: Karina Rodrigues dos Santos

Título: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Strongyloides ophidiae* (NEMATODA, STRONGYLOIDIDAE) PARASITAS DE SERPENTES.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo José da Silva
Presidente e Orientador
Departamento de Parasitologia
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Drª Lucia Helena O`Dwyer
Membro
Departamento de Parasitologia
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Raimundo Souza Lopes
Membro
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Drª Mônica Regina Vendrame Amarante
Membro
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Profª Drª Mere Erika Saito
Membro
Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agroveterinárias,
Universidade do Estado de Santa Catarina Lages – Santa Catarina

Data da Defesa: 18 de junho de 2008.

Aos meus pais e irmãos

Pais: Milton Mendes dos Santos e Eunice Rodrigues dos Santos

Irmãos: Marco Aurélio Rodrigues dos Santos e Thiago Rodrigues dos Santos

Agradeço por acreditarem que valeu, vale e sempre valerá a pena lutar pelos meus sonhos e pelos meus ideais. Por acreditarem que eu poderia crescer e ser alguém! Sabiam que eu precisava caminhar e que este caminho não seria fácil, pois muitas vezes quando os obstáculos me pareciam intransponíveis, quando a caminhada me parecia árdua e o desânimo me abatia, vocês estavam sempre caminhando ao meu lado, me incentivando e me enchendo de coragem, tornando assim minha caminhada mais agradável.

Hoje estamos comemorando, não o final da caminhada, mas sim uma etapa dela que foi vencida! Outras etapas virão e tenho a certeza de que estarão sempre ao meu lado na torcida por novas conquistas!

Obrigada!

Ao meu orientador Reinaldo José da Silva

À você cabe-me escrever a seguinte mensagem:

“Os vencedores da batalha da vida são os homens perseverantes que, sem se julgarem gênios se convenceram de que, só pela perseverança e esforço poderiam chegar ao fim almejado.”

Pois, encontrei em você um vencedor, por todo seu esforço e dedicação ao seu trabalho. Agradeço-te por ter partilhado comigo seus conhecimentos e experiências, com simplicidade e carinho, e principalmente por me ensinar a ser perseverante, e a lutar pelos meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço à toda minha grande família, que ocupa um espaço enorme em meu coração: tias (**Ivone, Evani, Aparecida** (*“in memória”*), **Neide, Marlene, Mirtix**) tios (**Roberto, Sérgio, Marcos, Paulo, Oswaldo** (*“in memória”*), **Osmar** (*“in memória”*), **Valter** (*“in memória”*), e à todos os meus primos e primas que são queridos, mas que são muitos por isso não poderei citá-los aqui, mas sabem que cada um ocupa uma lugar especial em minha vida. Agradeço-lhes por todo o apoio, carinho e principalmente por compreenderem a minha ausência!

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

Agradeço aos bolos e aos cafezinhos e as conversas com os amigos da Enfermidades Parasitárias e do laboratório Clínico: **Sônia Maria Santi** (Companheira), **Paula, Flávio, Thiago, Keila, Sueli, Soninha** (*“in memória”*), **Wilson e Sr. Matiasi**.

Agradeço aos amigos e “vizinhos”, assim denominados por mim: **Marlene, Cristininha, Cláudio (Cabeça), Claudinho, Cláudio (Canjica), João, André, Maricília e Ana**.

Agradeço às amigas de República: **Mere Erika Saito, Lívia Figueiredo, Graziela Barioni, Ana Cláudia dos Santos Valente, Luciana Bofoni, Karla Conceição H. de Campos, Letícia Macedo Soares, Joandes Henrique Fontequê, Telma Papatotto, Viviane Von Ah Lopes, Cynthia Lucidi, Fabíola Sangiorgio**, tenho certeza de que fomos uma grande família; e que foi e são inesquecíveis os momentos que passamos juntos.

Aos amigos **Sandra Bassani Silva, Luciana Pereira Machado, Eunice Kitamura, Veridiana Fernandes da Silveira, Patrícia neves Batina, Frederico G. klier, Celmira Calderón, Cleverson de Souza, Luciana Langrafe, Camilo Bulla, Márcia Hasegawa, Rodrigo Gonzalez Rodrigues, Luciano, Édna, Raquel Reis Martins, Flávia Quaresma, Flávia Santin, Adriane, Fabiana Ikeda, Cláudio Matoso**, por todo carinho, brincadeiras, risadas, cantorias, ensinamentos e principalmente pela amizade.

Aos amigos **Aline Otsuki, Jaqueline Quintana, Ricardo Carlos, Melanie e Pedro Paro e seus filhos Paula e Pedro Paro, Meire, Sr Lindenbergue e Eduardo**, amigos que participaram de várias etapas de minha vida, desde muito antes da realização deste sonho. Agradeço-lhes por cada dica, e por todo apoio, são como minha segunda família!

Obrigada aos meus eternos amigos de faculdade, **Raquel C. Lazinho, Priscila Bianchi Juliano, Waleska Marques, Denise de Campos Paulocci, Cristiane, Betina Metzger; Eduardo Romano, Carlos Eduardo Ambrósio (Caju)**, professora **Maria Adriana**, professora **Sílvia Cortopassi**. Enfim todos que fizeram parte de minha grande família de São João da Boa Vista.

Aos amigos Pós-graduandos da Parasitologia que me receberam com muito carinho: **Bianca, Hélen, Jayme, Bruna, Giane, Aruaque, Nelson, Thomaz, Marco, Rebeca, Adriano, Viviane, Eriquinha, Marcela, Juliana, Ana, André, Tatiana, Betina, Satie, Érica, Karina, Alberto, Letícia, Diego, Leticinha, Aline, Patrizia, Denise, Raquel, Fabiana, Daniel, Milena, Cristiane, Renata, Gustavo, Gisele, Taís, Maurícia, Luciene, Rogério, Carolina e Max**.

Em especial aos amigos **Bianca Cechetto, Karina Paduan, Gabriel, Samir, Jayme Souza Neto, Thiago Neves Batista, Flávio Paes**, professora **Mônica Regina Vendrame Amarante**, a professora **Márcia Guimarães, Jocilene e ao**

professor Paulo Eduardo Martins Ribolla, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores da Parasitologia, do Instituto de Biociências, Professora **Mônica**, Professora **Lucia Helena**, Professora **Luciene**, Professora **Teresa Cristina**, Professora **Semiramis**, Professor **Newton**, Professor **Wesley**, Professor **Alessandro** e Professor **Paulo**; que me acolheram 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.

Agradeço as novas amigas **Lidiane**, **Aline**, **Carla**, **Helena**, **Hélen**, pelos momentos de alegria e descontração entre as horas de trabalho.

Aos funcionários e amigos **Nilza**, **Salete**, **Ângela**, **Márcia**, **Maria**, **Valdir**, **Roberto** e **Heloy**, pelo grande auxílio que me dispensaram, pelo carinho e pelas boas risadas na hora do cafezinho.

À minha família de Botucatu, **Fábio Roberto Bursaca**, **Fabina**, **Ari**, **Dona Jeannete**, **dona Violeta**, **Isabella**, **Sr. João**, **Flávio**, **Ronaldo**, **Cristiane**, **Dona Vera**, **Sr. Celso**, **Dona Inês** (*“in memória”*) e **Fábio Mena**, meus sinceros agradecimentos por me acolherem e tornarem meus dias mais alegres.

Agradeço as queridas amigas de todas as horas: **Bianca**, **Jacqueline**, **Tamara**, **Negin**, por me acolherem na república com todo o carinho.

Aos amigos do curso de inglês: **Jumara**, **Alessandra**, **Ariane**, **Ana Paula**, **Fernanda**, **Ricardo**, **Neide** e **Janaina**, meus sinceros agradecimentos por me ensinarem que aprender pode ser muito divertido.

Aos amigos da seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Unesp, Campus Botucatu, **Denise**, **Maria** e **José Roberto**, por estarem sempre prontos e sempre com um sorriso amigo.

Às bibliotecárias: **Meirinha, Luciane e Selma** e demais funcionários da biblioteca do Campus da Unesp de Botucatu, pelo carinho e atenção.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP –Botucatu pela oportunidade de realização do mestrado e doutorado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, dispensado para a realização prática deste trabalho (número do processo 06/50968-8)

À CAPES pela bolsa concedida.

A vontade de se tornar algo melhor a cada dia é o que faz do ser humano uma máquina de sonhar.

Projetar idéias e desejos e lutar para transformar o que um dia foi um simples pensamento em uma situação real.

Nunca desistir de algo que se deseja muito e que se almeja fazer parte da vida.

O ser humano sonha!

Mas se ele apenas sonhasse nunca saberia do que é capaz,

É preciso conquistar os sonhos!

Autor anônimo.

Nunca deixem que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,

Ou que seus planos nunca vão dar certo,

Ou que você nunca vai ser alguém,

“Pois quem acredita sempre alcança!”

Trecho de Música de Renato Russo

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fêmea partenogenética de *Strongyloides ophidiae* (Strongyloididae) coletado em intestino de *Oxyrhopus guibei* (Colubridae), no município de Botucatu, SP. A) Visão geral do helminto; B) Detalhe da cauda – terminação pontiaguda; C) Detalhe da vulva e ovos; D) Detalhe do esôfago; E) Detalhe das voltas do ovário em torno do intestino; F) Detalhe do útero e ovos. A-D, clarificação com fenol; E-F, coloração por carmim clorídrico..... 29
- FIGURA 2.** Ovo e larvas de *Strongyloides ophidiae*. (A) ovo larvado; B) larva rabditóide; C) larva filarióide (L3); D) Detalhe da cauda entalhada da larva filarióide (L3). A-D, clarificação com fenol..... 33
- FIGURA 3.** A-D) Macho e fêmeas de vida livre obtidos a partir da coprocultura. A) visão geral do macho de vida livre; B) Detalhe da região posterior – notar a presença do espículo; C) visão geral da fêmea de vida livre; D) detalhe da região da vulva e ovos da fêmea de vida livre..... 35
- FIGURA 4.** Freqüência de parasitas encontrados nas diversas serpentes no estudo..... 37
- FIGURA 5.** Parasitas encontrados nas demais serpentes estudadas. A) ovo morulado; B) Ovos de cestódeos; C) *Cyclospora* sp.; D) *Kalicephalus* sp.; E) *Rhabdias* sp.; F), *Haplometroides buccicola*, coloração por carmim clorídrico..... 38
- FIGURA 6.** Fotografia do gel de agarose a 2% dos produtos amplificados pela PCR com o uso dos oligonucleotídeos SSUA e SSU22R (Dorris *et al.* 2002), de DNA extraído de um pool de 10 fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis* e pool de 8 fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides ophidiae*. Poço 1, marcador de tamanho molecular 100

pares de base (pb) (GE Healthcare Bucs, UK). Poços 2 e 3 (repetições), banda de amplificação de 350 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis*. Poço 4 e 5 (repetições), banda de amplificação de 350 pb a partir de amostras de DNA de *S. ophidiae*. Poço 6, reação contendo reagentes, sem adição de DNA..... 39

FIGURA 7. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Os sítios polimórficos são evidenciados pela ausência do símbolo (*). Os símbolos (-) representam a ausência de nucleotídeos (gaps)..... 40

FIGURA 8. Relação Filogenética da família Strongyloididae comparada com a família Rhabdiasidae..... 42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Procedência, data da coleta, sexo e informações sobre o parasitismo das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> incluídas no estudo.....	18
TABELA 2. Análise morfométrica de fêmeas partenogênicas de <i>Strongyloides</i> sp. (n=10) recuperadas de serpente <i>Oxyrhopus guibei</i>	28
TABELA 3. Morfometria dos ovos de <i>Strongyloides</i> sp. (Strongyloididae) obtidos nos exames coproparasitológicos.....	30
TABELA 4. Análise morfométrica das larvas rabditóides (L1) de <i>Strongyloides</i> sp. (Strongyloididae) obtidas da coprocultura.....	31
TABELA 5. Análise morfométrica das larvas rabditóides (L2) de <i>Strongyloides ophidiae</i> (Strongyloididae) obtidas da coprocultura.....	31
TABELA 6. Análise morfométrica das larvas L3 infectantes de <i>Strongyloides</i> sp. (Strongyloididae) obtidas da coprocultura.....	32
TABELA 7. Análise morfométrica de fêmeas de vida-livre e seus ovos de <i>Strongyloides ophidiae</i> (Strongyloididae) obtidos da coprocultura.....	34
TABELA 8. Espécies de serpentes parasitadas, número de serpentes estudadas e quantidade de serpentes parasitadas e parasitas encontrados.....	36

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. As Serpentes.....	8
2.2. A classe Nematoda.....	8
2.3. O gênero <i>Strongyloides</i>	9
2.4. Caracterização morfológica das espécies do gênero <i>Strongyloides</i> ..	11
2.6. Caracterização molecular das espécies do gênero <i>Strongyloides</i>	13
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Seleção dos animais.....	18
4.2. Análise parasitológica das fezes.....	21
4.3. Caracterização morfológica dos parasitos.....	21
4.4. Técnicas moleculares.....	22
4.4.1. Isolamento do DNA dos parasitos.....	22
4.4.2. Reações de PCR com emprego do SSU rDNA.....	22
4.4.3. Condições de PCR.....	23
4.4.4. Purificação dos produtos da PCR.....	23
4.4.5. Reação de seqüenciamento.....	23
4.4.6. Precipitação.....	24
4.4.7. Análise da seqüência.....	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Análise parasitológica das fezes e coproculturas.....	27
5.2. Caracterização morfológica dos parasitos.....	27
5.2.1. <i>Strongyloides ophidiae</i>	28
5.2.1.1. Fêmeas partenogenéticas.....	28
5.2.1.2. Ovos.....	30
5.2.1.3. Larva rhabditóide (L1).....	30
5.2.1.4. Larva rhabditóide (L2).....	31

5.2.1.5 Larva filarióide (L3).....	32
5.2.1.6. Fêmeas de vida-livre.....	33
5.2.1.7. Macho de vida-livre.....	33
5.3. Frequência dos parasitas encontrados.....	35
5.4. Caracterização molecular de <i>Strongyloides ophidiae</i>	39
5.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	39
5.4.2. Seqüenciamento.....	40
5.4.3. Análise filogenética.....	42
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	50
8. BIBLIOGRAFIA.....	52

SANTOS, K. R. **Caracterização morfológica e molecular de *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae) parasitas de serpentes.** Botucatu, 2008. 57p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

No Brasil, o gênero *Strongyloides* inclui duas espécies parasitas de répteis: *Strongyloide ophidiae* e *Strongyloides cruzi*. A primeira foi descrita em serpente *Mastigodryas bifossatus* e a segunda em lagartixa *Hemidactylus mabouya*. Na descrição de *S. ophidiae* apenas a fêmea partenogenética foi caracterizada em 1929 e, desde então, nenhum outro relato sobre esta espécie foi publicado. Estudos moleculares foram realizados com o objetivo de contribuir para a caracterização de *Strongyloides* spp. foram realizados, porém estes não incluíram *S. ophidae*. No presente estudo foi realizada a caracterização morfológica e molecular de *S. ophidiae* coletados em serpentes da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. De um total de 125 animais, apenas quatro encontraram-se parasitados por *S. ophidiae*, porém fêmeas partenogenéticas foram recuperadas de apenas um animal. Coproculturas foram realizadas para obtenção das larvas L1, L2 e L3, bem como machos e fêmeas de vida livre, os quais foram morfológicamente analisados. Os produtos da PCR apresentaram 350 pb e as seqüências de nucleotídeos (número de acesso Genbank EU287935) isoladas deste nematódeo de *Oxyrhopus guibei* apresentaram 98% de identidade com *Strongyloides procyonis* (número de acesso AB272234.1 e AB205054.1) e 97% de identidade com *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. “ex snake” e *Strongyloides fuelleborni* (Genbank AB277236.1, AF279916.2, AJ417031.1 e AJ407030.1, respectivamente). A análise filogenética das espécies da família Strongyloididae e Rhabdiasidae demonstrou que, embora apresente 97% de similaridade com outras espécies, *S. ophidiae* encontra-se isolado em um ramo da árvore filogenética, caracterizando uma identidade diferente em relação a outras espécies analisadas. O presente estudo caracterizou morfológica e molecularmente *S. ophidiae*, parasita de serpentes da região de Botucatu, São Paulo, Brasil.

SANTOS, K.R. **Morphological and molecular characterization of *Strongyloides ophidae* (Nematoda, Rhabdiasidae) infecting snakes.** Botucatu, 2008. 57p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In Brazil the genus *Strongyloides* includes two reptile parasite: *S. ophidae* and *S. cruzi*. The former was described in *Mastigodryas bifossatus* snake and the other in *Hemidactylus mabouya* gecko. In the description of *S. ophidae* just the partenogenetic females was characterized in 1929 and, ever since, no other report about this species was published. Molecular studies for the characterization of *Strongyloides* spp. were reported, however these did not include *S. ophidae*. In the present study the morphological and molecular characterization of *S. ophidae* obtained from snakes in Botucatu region, São Paulo State, Brazil was accomplished. Among the 125 studied animals only four snakes were found infected by *S. ophidae*, however partenogenetic females were recovered in only one animal. Fecal exams had been performed for obtaining L1, L2 and L3 larvae, as well as free-living males and females, which were morphologically analyzed. PCR products amplified from *S. ophidae* partenogenetic female samples presented about 350 bp. Nucleotide sequences (Genbank accession numbers EU287935) isolates from these nematodes from *Oxyrhopus guibei* presented 98% identity with *Strongyloides procyonis* (Genbank accession number AB272234.1 and AB205054.1) and 97% identity with *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. ex snake and *Strongyloides fuelleborni* (Genbank AB277236.1, AF279916.2, AJ417031.1 and AJ407030.1, respectively). The analysis of the phylogenetic relationship among the species of Strongyloididae and Rhabdiasidae demonstrated that, although there are similarity above 97% with the other species, *S. ophidae* was allocated in an isolated branch of the phylogenetic tree, characterizing a different identity in relation to other species analyzed. The present study contributed for the morphological and molecular characterization of *S. ophidae* from the Botucatu region, São Paulo State, Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Os répteis podem ser parasitados por diversos agentes, entre eles, alguns artrópodes (ácaros e carrapatos), protozoários (amebas, tricomonídeos, coccídeos e hemoparasitas) e helmintos (cestódeos, trematódeos e nematódeos). Entre os nematódeos parasitas de répteis, pode-se destacar a ocorrência de *Strongyloides* spp. Em estudos realizados em serpentes parasitadas por este nematódeo foram descritos os seguintes sintomas: anorexia, diarreia e perda de peso, e na histopatologia do pulmão desses animais foi encontrado severa pneumonia exsudativa e enterite (HOLT *et al.*, 1979; MADER, 1996; KLINGENBERG, 2000). Embora as alterações patológicas causadas por este parasita sejam conhecidas, há poucos trabalhos na literatura relacionados à caracterização morfológica e molecular das espécies desses nematódeos de répteis.

No Brasil, o gênero *Strongyloides* é representado por duas espécies parasitas de répteis: *Strongyloides ophidae* e *S. cruzi*. *S. ophidae* foi descrita por Pereira (1929) em *Mastigodryas bifossatus* no Estado de São Paulo, sendo que, na descrição da espécie, apenas a fêmea partenogenética foi caracterizada e, desde então, nenhum outro trabalho sobre a caracterização morfológica das outras formas evolutivas (larvas rabdtóides, filarióides bem como machos e fêmeas de vida livre) desta espécie foi publicado. *Strongyloides cruzi* foi descrito posteriormente por Rodrigues (1968) em *Hemidactylus mabouia* procedente do Rio de Janeiro. Para essa espécie, há uma descrição do macho e da fêmea de vida livre.

Recentemente, têm sido publicados na literatura alguns estudos moleculares com o objetivo de contribuir para a caracterização das espécies do gênero *Strongyloides* (DORRIS e BLAXTER, 2000; DORRIS *et al.*, 2002). Mesmo assim, esses estudos não incluíram *S. ophidae*.

Verifica-se que em relação às espécies do gênero *Strongyloides* parasitas de serpentes brasileiras, há uma carência muito grande na literatura sobre a caracterização morfológica e molecular, justificando assim a realização de estudos com essa abordagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As Serpentes.

As serpentes pertencem ao reino Animal, Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Serpentes. A classe Reptilia contém 5.141 espécies agrupadas em quatro ordens e três subordens de répteis viventes. (WALLACH e BOEVER, 1983; BORGES, 1999).

No Brasil existem nove famílias de serpentes, porém, as espécies mais encontradas na região de Botucatu, Estado de São Paulo, pertencem apenas a três famílias (Boidae, Colubridae e Viperidae), a saber: *Boa constrictor amarali* (Boidae); *Echinerteron* sp., *Oxyrhopus guibei*, *Philodryas olfersii*, *Philodryas patagoniensis*, *Sibynomorphus mikani*, *Spilotes pullatus*, *Thamnodynastes* sp., *Waglerophis merremii* (Colubridae); e *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedii* e *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae) (SILVA, 2000).

2.2. Classe Nematoda.

A classe Nematoda inclui vermes filiformes, cilíndricos e alongados; apresentam simetria bilateral; tubo digestivo completo; são de sexos separados, às vezes com grande dimorfismo sexual; podem ser parasitas, de vida livre, ou com alternância de gerações parasitária e de vida livre; são ovíparos, porém com algumas espécies vivíparas; e suas dimensões variam de 1 mm a 1 m (REY, 2001).

Estima-se que haja cerca de 500 mil espécies de nematódeos, sendo que existem numerosas espécies deste grupo que parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos (REY, 2001). Entre os répteis brasileiros, existem descritas mais de 120 espécies de nematódeos parasitas, entre eles os do gênero *Strongyloides* (VICENTE *et al.*, 1993).

2.3. O gênero *Strongyloides*.

O gênero *Strongyloides* inclui 52 espécies de nematódeos parasitas de vertebrados. Poucas espécies têm como hospedeiros, os anfíbios, os répteis e as aves. A maioria dos hospedeiros compreende mamíferos domésticos, incluindo gatos e cães, e os animais de produção como bovinos, ovinos e suínos (GROVE, 1989; DORRIS *et al.*, 2002). No Brasil, existem diversas espécies que acometem um grande número de hospedeiros (VICENTE *et al.*, 1990, 1993, 1995, 1997).

As espécies do gênero *Strongyloides* descritas nos diferentes grupos de vertebrados são: **mamíferos**: *S. chapini*, *S. ferreirai*, *S. fuelleborni*, *S. myopotami*, *S. papillosus*, *S. ransomi*, *S. ratti*, *S. stercoralis*, *S. venezuelenses*, *S. westeri*, *S. agoutii*, *S. akbari*, *S. ardeae*, *S. cebus*, *S. nasua*, *S. cubaensis*, *S. dasypodis*, *S. elephantis*, *S. erschowi*, *S. felis*, *S. lutrae*, *S. martis*, *S. minimum*, *S. mustelorum*, *S. nasua*, *S. planiceps*, *S. procyonis*, *S. putorii*, *S. quisicali*, *S. ratti*, *S. robustus*, *S. rostombekowi* e *S. vulpis* (GROVE, 1989; VICENTE *et al.*, 1997); **aves**: *S. avium*, *S. pavonis*, *S. turkemica*, *S. quisicali*, *S. oswaldoi*, *S. herodiae* e *S. minimum* (VICENTE *et al.*, 1995; GROVE, 1989); **anfíbios**: *S. carinii*, *S. pereirai*, *S. spiralis* e *S. physali*, *S. amphibiphilus*, *S. bufonis* (VICENTE *et al.*, 1990; GROVE, 1989); **répteis**: *S. cruzi*, *S. ophidiae*, *S. mirzai*, *S. serpentis*, *S. gulae* e *S. darevskyi* (GROVE, 1989; VICENTE *et al.*, 1993).

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à família Strongyloididae. São helmintos que 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 partenogenética, que é encontrada no intestino delgado (BAKER, 1983; KLINGENBERG, 1993, LANE e MADER, 1996; KLINGENBERG, 2000; HARVEY, 2001).

Strongyloides stercoralis foi descoberta pelo médico Louis Normand e descrita por Bavay (1876 *apud* LITTLE, 1966a), que o denominou de *Anguillula stercoralis* (“anguillula” = enguia, “stercus”= esterco). Estes pesquisadores encontraram larvas que *in vitro* se desenvolviam em machos e fêmeas de vida livre. Posteriormente, Bavay (1877), analisando o parasita encontrado por ele e o encontrado por Normand, concluiu que se tratavam de espécies distintas, pelas diferentes morfologias, denominando o seu nematódeo de *A. intestinales*. Grassi (1878)

encontrou a mesma fêmea parasita que Bavay (1876 *apud* LITTLE, 1966a) descreveu como *A. stercoralis* e observou que esta depositava ovos na luz intestinal e em cultura *in vitro* observou uma larva com cauda truncada. Grassi (1879a *apud* LITTLE, 1966a), colocou o nematódeo encontrado por ele no gênero *Strongyloides* e em outro trabalho (GRASSI, 1979b *apud* LITTLE, 1966a), o denominou de *Strongyloides intestinales*. Finalmente, Stiles e Hassal (1902 *apud* NEVES *et al.* 2005), revendo a taxonomia deste nematódeo, definiram a espécie como *S. stercoralis* (“*Strongylus*” = arredondado = esférico) (LITTLE, 1966a; GROVE, 1989; NEVES *et al.*, 2005).

Alfieri (1908) encontrou um nematódeo similar ao *S. stercoralis* no intestino de um sapo e considerou a possibilidade deste atuar como reservatório da infecção para o homem. Loss (1911) e Baylis (1923) também encontraram parasitas semelhantes em mamíferos, aves e répteis (GROVE, 1989).

As conseqüências da infecção por nematódeo do gênero *Strongyloides* em répteis foram descritas por Klingenberg (1993) sendo elas: anorexia, diarreia e perda de peso, e na histopatologia do pulmão desses animais foram encontrados severa pneumonia exsudativa e enterite. Holt *et al.* (1979) realizaram exames histopatológicos do intestino delgado e encontraram hiperemia, associado com hemorragia e reação inflamatória da lâmina própria. Estes ao examinarem o pulmão dessas serpentes encontraram pneumonia exsudativa e crescimento bacteriano após cultura do exsudato. Também relatam uma massa em pâncreas que na histopatologia mostrou regiões com infiltrados inflamatórios. Por outro lado, a identificação das espécies do gênero *Strongyloides* que acometem as serpentes brasileiras é ainda precária.

No Brasil, *S. ophidiae* foi originalmente descrito infectando *M. bifossatus* (= *Drymobius bifossatus*) (PEREIRA, 1929) e apenas a fêmea partenogenética foi descrita.

Na Índia, Mirza (1935) descreveu um *Strongyloides* encontrado em uma serpente *Eryx johnii* e a denominou de *S. stercoralis* var. *eryxi* e, posteriormente, Singh (1954) examinando serpentes da espécie *Ptyas mucosus* encontrou esses mesmos nematódeos e redescreveu a espécie denominando-a de *S. mirzai*. Relata ainda que, analisando a parasitemia das serpentes *Ptyas mucosus*, encontrou uma

grande quantidade de serpentes parasitadas, e serpentes com baixas (de 10 a 15 exemplares em um único hospedeiro) e com altas infecções (de 100 a 125 espécimes por hospedeiro) (SINGH, 1954).

Little (1966b) realizou estudos morfológicos de *Strongyloides gulae* e *S. serpentis* encontrados em *Natrix cyclopion cyclopion*, *N. taxispilota taxispilota*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *A. contortrix contortrix*, *Coluber constrictor flaviventris*, *Lampropeltis getulis holbrookii* e *Heterodon platyrhinos platyrhinos*.

Holt *et al.* (1979), reportaram três casos de infecção pelo nematódeo *Strongyloides* sp. em serpentes *Python reticulatus*, *Elaphe obsoleta quadrivittata* e *Elaphe obsoleta obsoleta*. O relato de Holt *et al.* (1979) foi baseado em achados de ovos e larvas de *Strongyloides* nas fezes destas serpentes, além de apresentar dados histopatológicos de intestino, pulmão e pâncreas. Entretanto, os autores não isolaram e nem caracterizaram a fêmea partenogenética.

Recentemente, Dorris *et al.* (2002), caracterizaram molecularmente *Strongyloides* de serpentes, mas não definiram as espécies envolvidas no parasitismo, pois possuíam apenas as larvas infectantes (L3), obtidas de fezes de *Naja* sp..

O registro mais recente sobre a ocorrência de *S. ophidiae* no Brasil é o de Rossellini *et al.* (2004), que relatou sua presença em dois novos hospedeiros: *C. durissus terrificus* e *P. olfersii*.

2.4. Caracterização morfológica das espécies do gênero *Strongyloides*.

A dificuldade para se definir características diferenciais para *Strongyloides* spp. fez com que muitas espécies deste gênero fossem identificadas apenas com base nas espécies hospedeiras. Este aspecto dificultou a identificação das espécies de *Strongyloides* relatadas em outros hospedeiros, como por exemplo, Alfire (1908) que encontrou *S. stercoralis* em sapos; Baylis (1923) que relatou a ocorrência de nematódeos semelhantes a *S. stercoralis* em mamíferos, aves e répteis; e Ranson (1911 *apud* LITTLE, 1966a) que encontrou *S. papilosus* em ovinos.

Para a identificação precisa destes nematódeos é necessária a caracterização morfológica de todas as formas evolutivas do parasito, ou seja, ovo, larva, macho e fêmea de vida livre, e a fêmea parasita.

Descrições detalhadas de estágios de vida-livre, e da fêmea parasitária de *S. stercoralis*, *S. fülleborni*, *S. cebus*, *S. myopotami*, *S. venezuelensis*, *S. ratti*, *S. lutrae*, *S. dasypodis*, *S. ardeae*, *S. physali*, *S. serpentis* e *S. gulae* foram realizadas por Little (1966b) e *S. cruzi* e *S. ophidiae* por Rodrigues (1868) e Pereira (1929), respectivamente.

Little (1966a,b) definiu características que servem como base para um detalhamento do gênero, como:

- Ovários, que em algumas espécies de *Strongyloides* podem estar espiralados, tanto anteriormente como posteriormente ao redor do intestino, sendo o número de voltas um auxílio na identificação das espécies.

- A forma do estoma (orifício bucal) , vista em uma posição “*en face*”, provou ser o critério mais valioso para essa caracterização, este pode ser classificado dentro de quatro grupos: 1simples, angular, complexo e com dentes esofagianos. Um estoma angular tem um ou mais ângulos: triangular, retangular, hexagonal e em forma de seta. Um estoma complexo possui multicâmaras, com câmaras de diferentes números e formas. O estoma com dentes esofagianos tem projeções que passam pelo fim da extremidade anterior do esôfago ao limite do estoma.

- O número e arranjo das papilas genitais nos machos de vida livre e as papilas cefálicas dos estágios adultos de ambos os sexos, são características importantes.

- A posição da vulva na fêmea de vida livre, que na maioria das espécies forma um eixo de 90 graus entre o corpo e a vagina, enquanto outros apresentam o eixo rotacionado posteriormente, fazendo com que os lábios da vulva se projetam ventralmente.

- O arranjo dos ovos em uma única fileira no interior do útero da fêmea de vida-livre, são características utilizadas para a determinação das espécies.

Ainda em serpentes, foram descritas as espécies *S. serpentis* (LITTLE, 1966b) e *S. ophidiae* (PEREIRA, 1929). A fêmea parasita de *S. serpentis* apresenta estoma oval; ovário anterior usualmente espiralado duas vezes ao redor do intestino, e ocasionalmente reto; ovário posterior usualmente reto e ocasionalmente fazendo um espiral parcialmente; útero com até 10 ovos, medindo de 44 a 55 μm de comprimento por 23 a 26 μm de largura. Os ovos ainda apresentaram estágios de

desenvolvimento embrionário. A fêmea de vida livre apresentou o corpo sem constrição atrás da vulva; lábios da vulva proeminentes e útero com ovos dispostos em uma única fileira. O macho de vida livre apresenta espículo moderadamente curvado; papila pré-anal, medioventral próxima ao ânus; o espículo era diferente de todas as espécies; em vista lateral, anteriormente era reto, alargando-se gradualmente e alcançando maior largura próximo ao começo do terço posterior do comprimento, estreitando abruptamente e terminando ventralmente encurvado (ponta em forma de anzol).

A fêmea partenogenética de *S. ophidiae*, que é a única espécie descrita em serpentes brasileiras, apresenta as seguintes características morfológicas: corpo delgado, afinando-se um pouco anteriormente, e terminando com uma cauda cônica. Extremidade anterior truncada, com pequeno orifício bucal. Esôfago alongado, mais dilatado em sua porção posterior, e medindo de 1,05 a 1,13 mm (cerca de 1/3 do comprimento do corpo), e tendo de largura, posterior, cerca de 0,03 mm. Vulva saliente, na reunião dos 2/3 anteriores com o terço posterior do corpo, distando da extremidade posterior, de 0,8 a 1,2 mm, ovejetero curtíssimo, aparelho genital didelfo e anfidelfo, com úteros divergentes, contendo de 6 a 7 ovos, com um ou dois blastômeros. O ramo anterior do aparelho genital chega a apresentar cerca de 0,03 mm do esôfago e o ramo posterior vai de 0,06 a 0,1 mm da extremidade posterior do corpo. Ânus, de 0,07 a 0,1 mm da extremidade posterior. Ovos, com cerca de 0,038 mm de comprimento por 0,015 a 0,023 mm de largura máxima.

2.6. Caracterização molecular das espécies do gênero *Strongyloides*.

Atualmente existem vários modelos que possibilitam a determinação da variabilidade genética de diferentes organismos. Estes modelos foram desenvolvidos a partir de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e vêm possibilitando o conhecimento da filogenia de diversas espécies animais.

Em relação ao gênero *Strongyloides*, poucos estudos moleculares foram realizados para caracterização genética das espécies. Dorris *et al.* (2002) avaliaram *Strongyloides* de serpentes, porém não definiram as espécies incluídas no estudo, uma vez que possuíam apenas as larvas infectantes (L3). Estes autores utilizaram o segmento correspondente à pequena subunidade do gene de Rna ribossômico (SSU

rDNA), amplificado pela PCR, utilizando-se oligonucleotídeos universais SSUA/SSU22R.

Além deste exemplar obtido de serpentes, outras 9 amostras de *Strongyloides* foram estudadas a partir de uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo bovinos, roedores, primatas e as três espécies conhecidas do ser humano (DORRIS *et al.*, 2002).

As seqüências do gene SSU rDNA de *Strongyloides* spp. foram muito similares entre si, quando colocadas na árvore filogenética, sendo que algumas espécies apresentaram ramificações próximas.

Empregando-se parâmetros de máxima probabilidade (Bayesian Markov chain Monte Carlo), *S. cebus*, *S. papillosus* e *S. fuelleborni kelleyi* apresentaram a mesma seqüência de nucleotídeos assim como *S. stercoralis*, *S. fuelleborni fuelleborni* e *Strongyloides* sp. ex. snake, neste estudo o gênero foi agrupado em dois cladogramas: o primeiro, denominado de “stercoralis”, que inclui *Strongyloides* sp. ex. snake, *S. stercoralis* e *S. fuelleborni fuelleborni* e o segundo denominado de “cebus”, que contém *S. ratti*, *S. suis*, *S. venezuelensis*, *S. papillosus*, *S. fuelleborni kelleyi* e *S. cebus*.

Dorris *et al.* (2002) destacam o fato de que *Strongyloides* sp. ex. snake seja grupo-irmão para parasitas de primatas, por terem sido agrupados no mesmo cladograma dos dois maiores agentes causadores de estrogiloidíase em humanos (*S. stercoralis* e *S. fuelleborni*).

Além da existência de poucos estudos moleculares com o gênero *Strongyloides*, as espécies parasitas de répteis não foram completamente estudadas. Alguns estudos nesse contexto apresentaram apenas dados morfológicos enquanto em outros somente dados moleculares foram abordados, comprovando assim a necessidade de realização de mais estudos, principalmente, aqueles que fazem uma abordagem conjunta das duas técnicas.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo a caracterização morfológica e molecular de *S. ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae) parasitas de serpentes no Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais.

Foram avaliadas 125 serpentes de diversas espécies e procedências, 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 identificados e os dados referentes a esses foram anotados e protocolos individuais (Tabela 1).

Foram coletadas amostras de fezes desses animais, para realização de exames coproparasitológicos com a finalidade de se determinar as serpentes parasitadas por nematódeos do gênero *Strongyloides*.

TABELA 1. Espécie, procedência, data da coleta e sexo das serpentes incluídas no estudo.

Animal	Espécie	Procedência	Data da coleta	Sexo
001	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Pardinho, SP	05/08/2005	F
002	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Itatinga, SP	04/07/2005	
003	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Avaré, SP	29/07/2005	
004	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Lençóis Paulista, SP	19/07/2005	F
005	<i>Waglerophis merremi</i>	Lençóis Paulista, SP	18/07/2005	
006	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio da Moçada, Botucatu, SP	14/07/2005	F
007	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, km 12, Pardinho, SP	12/07/2005	F
008	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, km 12, Pardinho, SP	12/07/2005	M
009	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, km 12, Pardinho, SP	12/07/2005	M
010	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, km 12, Pardinho, SP	12/07/2005	M
011	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Anhumas, SP	08/08/2005	F
012	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Lageado-Cafezal, SP	18/07/2005	F
013	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Pesqueiro do Mariano, Botucatu, SP	19/07/2005	M
014	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, Km 12, Pardinho, SP	12/07/2005	F
015	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda em Anhembi, SP	07/07/2005	M
016	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Pesqueiro do Mariano, Botucatu, SP	19/07/2005	F
017	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, Km 12, Pardinho, SP	12/01/2005	F
018	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	31/08/2005	M
019	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cerqueira César, SP	29/08/2005	F
020	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Edgárdia, Botucatu, SP	29/08/2005	F
021	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Jacioba, Pardinho, SP	12/07/2005	F
022	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Itatinga, SP	13/08/2005	F
023	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Fazenda Edgárdia, Botucatu,	01/09/2005	M

		SP		
024	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Rubião Junior, Botucatu, SP	30/08/2005	F
025	<i>Thamnodynastes</i> sp.	Itatinga, SP	13/08/2005	I
026	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Estrada Pirambóia, SP	09/09/2005	M
027	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Horto florestal, Anhembi, SP	06/09/2005	M
028	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Morada do Sol, Botucatu, SP	12/09/2005	M
029	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda São Vicente, Itatinga, SP	14/09/2005	M
030	<i>Spilotes pullatus</i>	Agropecuária, São Marino, SP	15/09/2005	M
031	<i>Boa constrictor amarali</i>	Rio Bonito, Botucatu, SP	06/07/2005	F
032	<i>Bothrops neuwiedii</i>	Sítio da Usina São Manoel, SP	26/07/2005	F
033	<i>Bothrops jararaca</i>	Granja Monte Alvão, Itatinga, SP	15/09/2005	F
034	<i>Bothrops jararaca</i>	Horta, Fazenda Monte Alegre, SP	16/09/2005	
035	<i>Philodryas patagoniensis</i>	COHABI, Botucatu, SP	28/09/2005	F
036	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	16/09/2005	F
037	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Rubião Junior, Botucatu, SP	08/09/2005	F
038	<i>Echinantera occipitalis</i>	Rubião Junior, Botucatu, SP	08/09/2005	F
039	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	20/09/2005	F
040	<i>Bothrops alternatus</i>	Lins, SP	29/07/2005	F
041	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Atílio Cocho, Pardinho, SP	16/11/2005	F
042	<i>Bothrops jararaca</i>	Lageado, Botucatu, SP	17/11/2005	F
043	<i>Echinantera occipitalis</i>	Botucatu, SP	08/11/2005	F
044	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Rau Epaminondas Madeira s/n	07/11/2005	M
045	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Sítio Paraizinho, Pardinho, SP	15/11/2005	F
046	<i>Boa constrictor amarali</i>	Rubião Júnior, Botucatu, SP	24/11/2005	M
047	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Paraizinho, Pardinho, SP	05/10/2005	F
048	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Bofete, SP	15/11/2005	M
049	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Santa Luiza, Taguaí, SP	11/10/2005	M
050	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda São Pedro, Conchas, SP	10/11/2005	M
051	<i>Spilotes pullatus</i>	Avaré, SP	10/01/2006	M
052	<i>Rachidelus brazili</i>	São Manoel, SP	08/11/2005	F
053	<i>Waglerophis merremi</i>	Cerqueira César, Botucatu, SP	24/11/2006	F
054	<i>Phalotris lativittatus</i>	Rubião Júnior, Botucatu, SP	20/11/2005	M
055	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Botucatu, S.P.	19/12/2005	M
056	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Lageado, Botucatu, SP	27/01/2006	F
057	<i>Liophis</i> sp.	Botucatu, SP	06/02/2006	F
058	<i>Erythrolampus aesculapii</i>	Botucatu, SP	09/01/2006	F
059	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Botucatu, SP	05/02/2006	F
060	<i>Boa constrictor amarali</i>	São Pedro, SP	06/01/2006	
061	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Botucatu, SP	20/03/2006	
062	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Botucatu, SP	12/02/2006	F
063	<i>Waglerophis merremi</i>	Botucatu, SP	12/03/2006	F
064	<i>Boa constrictor amarali</i>	Botucatu, SP	14/03/2006	
065	<i>Bothrops moojeni</i>	Lençóis Paulista, SP	13/02/2006	F
066	<i>Boa constrictor amarali</i>	Botucatu- S.P.	05/04/2006	F
067	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Fazenda Lageado, Botucatu, SP	29/03/2006	F
068	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Lageado, Botucatu, SP	10/04/2006	M
069	<i>Micrurus corallinus</i>	Rubião Júnior, Botucatu, SP	11/04/2006	F
070	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	11/04/206	M
071	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	SABESP, Botucatu, SP	04/04/2006	
072	<i>Bothrops jararaca</i>	Casa da Agricultura Pardinho, SP	19/04/2006	F
073	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Fazenda Lageado, Botucatu, SP	18/04/2006	M
074	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Fazenda Lageado, Botucatu, SP	18/04/2006	F
075	<i>Boa constrictor amarali</i>	Rio Bonito, Botucatu, SP	01/04/2006	F

076	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	20/04/2006	M
077	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	20/04/2006	F
078	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	20/04/2006	F
079	<i>Dipsas indica</i>	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	20/04/2006	M
080	<i>Dipsas indica</i>	Sítio Boa Vista Negrão, Botucatu, SP	20/04/2006	F
081	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Dois Rios, Laranjal Paulista, SP	20/04/2006	F
082	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fazenda Feltrin- Bofete	24/04/2006	M
083	<i>Bothrops neuwiedii</i>	Condomínio Califórnia II , Rubião Júnior, Botucatu, SP	24/04/2006	M
084	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Rio Santa Inácia, Bofete, SP	01/05/2006	M
085	<i>Boa constrictor amarali</i>	Bofete, SP	01/05/2006	M
086	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Rio Bonito, Botucatu, SP	02/05/2006	F
087	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Novo Horizonte, Botucatu, SP	04/05/2006	F
088	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Botucatu, SP	16/05/2006	F
089	<i>Simophis rhinostoma</i>	Botucatu, SP	16/05/2006	F
090	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Bocaininha, Santa Maria da Serra, SP	11/04/2006	M
091	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio da Andorinhas, Pardinho, SP	04/05/2006	M
092	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Bocaininha, Santa Maria da Serra, SP	11/05/2006	F
093	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Duratex, Botucatu, SP	24/05/2006	M
094	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	São Manoel, SP	24/05/2006	M
095	<i>Bothrops neuwiedii</i>	Botucatu, SP	04/06/2006	F
096	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Distrito Maristela, Botucatu, SP	05/06/2006	M
097	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Avaré, SP	30/05/2006	M
098	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Unesp Lageado, Botucatu, SP	01/06/2006	M
099	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	31/05/2006	M
100	<i>Bothrops alternatus</i>	Sabesp, Botucatu, SP	31/07/2006	F
101	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	10/07/2006	F
102	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio N. S. Rosário, Conchas, SP	02/08/2006	F
103	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Chácara Santo Antônio, Botucatu, SP	26/07/2006	M
104	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Botucatu, SP	17/08/2006	M
105	<i>Dipsas indica</i>	Recanto da Amizade, Botucatu, SP	30/08/2006	M
106	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Casa Branca, Anhembi, SP	06/09/2006	F
107	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Anhembi, SP	01/08/2006	F
108	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Viana, Laranjal Paulista, SP	10/08/2006	M
109	<i>Bothrops jararaca</i>	Granja, Botucatu, SP	14/09/2006	M
110	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Itatinga, SP	14/09/2006	F
111	<i>Boa constrictor amarali</i>	Botucatu, SP	11/07/2006	M
112	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	-	-
113	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	-	-
114	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	-	-	-
115	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Botucatu, SP	11/10/2006	F
116	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Chácara Santo Antônio, Botucatu, SP	21/10/2006	F
117	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Anhembi, SP	03/10/2006	F

118	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Anhembi, SP	03/10/2006	F
119	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Botucatu, SP	04/10/2006	M
120	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Pardinho, SP	17/10/2006	F
121	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Botucatu, SP	30/10/2006	F
122	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Eucatex, Botucatu, SP	13/11/2006	F
123	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sítio Santa Terezinha, São Francisco, Itaporanga, SP	11/2006	F
124	<i>Oxyrhopus guibei</i>	Potaria Lageado, Botucatu, SP	16/01/2007	M
125	<i>Boa constrictor amarali</i>	Edgárdia, Botucatu, SP	11/01/2007	F

4.2. Análise parasitológica das fezes.

Para os exames coproparasitológicos foram realizados os métodos de Willis-Molley (método da flutuação) e a técnica sedimentação simples (HOFFMANN, 1987). Os exames foram realizados com objetivo de detecção de ovos larvados característicos de nematódeos dos gêneros *Strongyloides* ou *Rhabdias*.

Para a identificação das amostras de animais infectadas por *Strongyloides*, foi realizada a coprocultura com as amostras das fezes positivas para ovos larvados. Para tanto, esses ovos foram incubados utilizando papel filtro umedecido placas de Petri em temperatura de 25-27°C e umidade relativa alta (80%), durante sete dias. Para a extração das larvas infectantes foi utilizado o Método de Roberts e O'Sullivan (HOFFMANN, 1987).

Além disso foram utilizados como substratos: fezes esterilizadas de eqüinos, xaxim autoclavado e carvão em grãos; a água utilizada para umidificar a cultura também foi esterilizada.

4.3. Caracterização morfológica dos parasitos.

Os ovos e larvas de *Strongyloides* obtidos na coprocultura e os adultos coletados do intestino das serpentes foram imediatamente analisados em sistema computadorizado de análise de imagens Lite Qwin 3.1 (Leica, Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

As larvas rabditóides (L1 e L2) foram identificadas pela morfologia do esôfago e do corpo. As larvas L3 foram diferenciadas pela morfologia do esôfago e da cauda, que é entalhada no gênero *Strongyloides*.

As formas adultas parasitas foram coletadas em animais que foram a óbito no cativeiro ou através de lavagem intestinal das serpentes recém capturadas,

empregando-se solução fisiológica em volume correspondente a 1% do peso corporal do animal, como recomendado por Mader (1996).

Para as análises morfométricas foram utilizadas 10 fêmeas partenogênicas recuperadas de *O. guibei* (animal 004) e larvas L1, L2 e L3 das serpentes *S. mikanii* (animal 001), *O. guibei* (animal 045) e uma *Thamnodynastes* sp.(animal 025), encontradas após a coprocultura e fêmeas de vida livre.

Nessa etapa, as fêmeas partenogênicas foram clarificadas com fenol e mensuradas o comprimento e largura, o comprimento e largura dos ovos, comprimento do esôfago, distância da vulva a extremidade posterior, localização do aparelho genital, distância do ânus a extremidade posterior. Além disso, os machos e fêmeas de vida livre foram também analisados morfologicamente após terem sido recuperados da coprocultura. Nas formas de vida livre foram mensurados: comprimento e largura do corpo, do esôfago, distância do anel nervoso à extremidade anterior, tamanho do gubernáculo e espículo, distância da abertura anal à extremidade posterior e nas fêmeas ainda foram mensuradas a distância da vulva à extremidade posterior e comprimento e largura dos ovos.

4.4. Técnicas moleculares.

4.4.1. Isolamento do DNA dos parasitos.

Fêmeas partenogênicas de *S. ophidae* foram fixadas em etanol 70%, AFA (álcool, formol e ácido acético) e álcool isopropílico até a realização do estudo. O DNA genômico foi extraído de 8 nematódeos com a utilização do kit de extração de DNA Quiamp da (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

4.4.2. Reações de PCR com o emprego do SSU rDNA.

O segmento correspondente à seqüência do gene SSU rDNA (pequena subunidade ribossomal do DNA ribossômico) foi amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos universais SSUA (Forward 5'- AAA GAT TAA GCC ATG CAT G -3') e SSU22R (Reverse 5'- GCC TGCTGC CTT CCT TGG A -3') segundo as condições descritas por Dorris *et al.* (2002).

Para amplificação do material genético foi utilizado termociclador My Cycler Thermal Cycler (Bio-Rad®). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (Ameresco®) corado com brometo de etídio (0,5 µL/mL) utilizando-se uma cuba horizontal Hoefer HE 99 (GE Healthcare, Bucks, U.K.) em solução de TAE 1X (Tris-base 0,4 M; ácido acético 0,20M e solução de EDTA 0,5M, pH 8,0). Após a amplificação as amostras receberam 2 µL de corante de corrida (0,01g de azul de bromofenol e 10 mL de TE para um volume final de 10 mL), e em seguida aplicadas no gel. A visualização das bandas foi feita em transluminador de luz UV (ultravioleta).

4.4.3. Condições de PCR.

A amplificação foi realizada numa reação com 10 µl, 10 mM Tris-HCl 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3, 100 mM de cada dNTP, 100 ng de DNA genômico e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (GE Healthcare, Bucks, U.K.). A PCR compreendeu 35 ciclos, precedidos por 95°C durante 5 minutos. Cada ciclo foi constituído por 30 segundos, a 95°C (temperatura de desnaturação), 30 segundos a 58,1°C (temperatura de anelamento) e 30 segundos a 72°C (temperatura de síntese de DNA).

4.4.4. Purificação dos produtos da PCR.

As amostras resultantes da reação de PCR foram purificadas com auxílio da enzima EXOSAP - IT, (USB). Para esta reação foram utilizados 2 µl da enzima para cada 8 µl de amostra, incubados a 37°C por 1h e a 80°C por 20 minutos.

4.4.5. Reação de seqüenciamento.

A reação de seqüenciamento foi preparada para um volume final de 20 µl. Os reagentes foram utilizados nas seguintes proporções: 4 µl de 2,5x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 4 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol do ONT M13 forward, e 4 µl do DNA e H₂O q.s.p.. As reações foram igualmente realizadas com termociclador Whatman Biometra® (T Gradient). Os ciclos de temperatura foram programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4

min, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. As cromatografias de seqüenciamento foram realizadas no Seqüenciador ABI PRISM[®] 377 (Applied Biosystems).

4.4.6. Precipitação.

Os produtos das reações de seqüenciamento foram submetidos ao protocolo de precipitação alcoólica. Para cada amostra foram adicionados 80 µl de isopropanol 65%, e, a seguir, a mistura foi incubada a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a velocidade de 2000g por 25 minutos, a temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo o tubo e, adicionando-se, em seguida, 200 µl de etanol 70% e centrifugando-se a velocidade de 2000g por 5 minutos a temperatura ambiente. Todo o etanol foi removido com auxílio de micropipeta, uma vez que resíduos desta substância podem resultar em manchas fluorescentes, interferindo na leitura do gel. A amostra foi seca a temperatura ambiente e o DNA foi eluído em 2 µl de tampão de amostra contendo Formamidina Hi-Di[™] (Applied Biosystems) + tampão de corrida (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1) (Applied Biosystems, USA). No momento da aplicação no gel, as amostra foram aquecidas a 95° C por 5 minutos e rapidamente transferida para o gelo.

4.4.7. Análise da seqüência.

A seqüência forward e reverse, foram geradas com auxílio do programa MERGER ([HTTP://bioweb.pasteur.fr/seganal/alignment/intro-uk.html](http://bioweb.pasteur.fr/seganal/alignment/intro-uk.html)) para obtenção da seqüência consenso que a seguir foram comparadas com outras disponíveis no GenBank, e identificadas utilizando-se o BLASTn ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi)). Alinhada utilizando o programa CLUSTAL X versão 1.81 (THOMPSON *et al.* 1997). Posteriormente a seqüência foi utilizada para a construção da árvore filogenética utilizando-se o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2001). Taxas de divergência foram conduzidas, utilizando-se os métodos de máxima parcimônia (MP) e distância (NJ) na reconstrução filogenética do fragmento estudado. Para se estimar o índice de

consistência das análises de distância foram utilizadas árvores com teste de bootstrap sobre 1000 réplicas.

5. RESULTADOS

5.1. Análise parasitológica das fezes e coproculturas.

Das 125 serpentes analisadas, foram encontrados ovos larvados nas fezes, característicos de *Strongyloides* spp. ou *Rhabdias* spp. em 39 indivíduos (31,2%), pela técnica de Willis e/ou pelo exame direto.

Na coprocultura, amostras de fezes de apenas 4 animais (3,2%) encontraram-se positivas para *Strongyloides* sp., sendo um exemplar de *S. mikanii* (animal 001), duas *O. guibei* (animais 004 e 045) e uma *Thamnodynastes* sp.(animal 025). Entretanto, oito serpentes que apresentaram resultados negativos nos exames coproparasitológicos, quando vieram a óbito, apresentaram-se parasitadas por nematódeos do gênero *Rhabdias*.

5.2. Caracterização morfológica dos parasitas.

Dos quatro animais infectados por *S. ophidiae*, foi possível recuperar fêmeas partenogenéticas de apenas uma serpente, pois três animais vieram a óbito no cativeiro, porém a necropsia dos mesmos não foi realizada devido ao avançado estado de decomposição dos animais.

As análises morfométricas das 10 fêmeas partenogenéticas recuperadas de *O. guibei* (animal 004) e larvas L1, L2 e L3 das serpentes *S. mikanii* (animal 001), das duas *O. guibei* (animal 045) e *Thamnodynastes* sp.(animal 025) e ovos das serpentes *O. guibei* (animal 004) e *Thamnodynastes* sp. (animal 025), estão apresentadas nas Tabelas de 2, 3,4,5, 6 e Figuras 1 e 2.

5.2.1. *Strongyloides ophidiae*.

5.2.1.1. Fêmeas partenogenéticas.

As fêmeas partenogenéticas apresentaram o corpo delgado, terminado com uma cauda cônica. A extremidade anterior apresentou-se truncada, com um pequeno orifício bucal (estoma), mas neste trabalho, não foi possível a visualização do mesmo, pois os exemplares analisados apresentaram resquícios de mucosa e/ou detritos.

O esôfago dessa fêmea apresentou-se longo, filariforme, e o anel nervoso não foi observado. O sistema reprodutor é didelfo e anfidelfo, curto e com ovos (2 a 5) e a vulva apresentou-se localizada no meio do corpo. O ovário anterior apresentou duas voltas em torno do intestino e o posterior uma volta parcial ao redor do intestino e, além disso, o ramo posterior do ovário se estende até quase a abertura anal (Figura 1). O resultado da análise morfométrica está apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. Análise morfométrica de fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides* sp. (n = 10) recuperadas de serpente *Oxyrhopus guibei*.

Variáveis (μm)	Média	Mínimo	Máximo
Comprimento	4700,3	3524,8	5371,8
Largura	50,6	41,2	57,9
Esôfago total	1632,6	1425,8	1902
Distância ramo genital anterior-esôfago	235,1	102,6	374,1
Distância ramo posterior-extremidade posterior	328,1	130,4	604
Anus	13,6	9,5	30,8
Distância vulva-extremidade posterior	2292,5	1759,4	2620,4
Distância ânus-extremidade posterior	105,3	63,8	123,8
Ovos (n = 57)			
Comprimento	51,8	48,4	54,5
Largura	32,4	30,5	33,6



FIGURA 1. Fêmea partenogenética de *Strongyloides ophidiae* (Strongyloididae) coletado em intestino de *Oxyrhopus guibei* (Colubridae), no município de Botucatu, SP. A) Visão geral do helminto; B) Detalhe da cauda – terminação pontiaguda; C) Detalhe da vulva e ovos; D) Detalhe do esôfago; E) Detalhe das voltas do ovário em torno do intestino; F) Detalhe do útero e ovos. A-D, clarificação com fenol; E-F, coloração por carmim clorídrico.

5.2.1.2. Ovos.

Os ovos apresentaram-se elípticos com casca delgada, larvados e de medidas ligeiramente maiores daqueles analisados ainda no útero das fêmeas partenogénicas (Tabela 3 e Figura 2).

TABELA 3. Morfometria dos ovos de *Strongyloides* sp. (Strongyloididae) obtidos nos exames coproparasitológicos.

Variáveis	Animais	
	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n = 9)	<i>Thamnodynastes</i> sp. (n=4)
Comprimento	75,8 (39,93 - 85,62)*	63,1 (54,02-67,56)
Largura	43,9 (37,14 - 47,95)	33,1 (31,02-34,65)

* Os valores apresentados representam a média (mínimo - máximo).

5.2.1.3 Larva rhabditóide (L1).

As larvas de primeiro estágio foram encontradas após a realização da coprocultura. Estas apresentaram esôfago do tipo rhabditiforme, com corpo, istmo e bulbo distintos e evidentes; anel nervoso peri-esofágico envolvendo a região do istmo. O intestino possui células indiferenciadas e luz retilínea e apresentam cauda afilada. O primórdio genital foi raramente observado. Os dados morfométricos estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Análise morfométrica das larvas rhabditóides (L1) de *Strongyloides* sp. (*Strongyloididae*) obtidas da coprocultura.

Variáveis (μm)	Animais			
	<i>Sibynomorphus mikanii</i> (n=18)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n=20)	<i>Thamnodynastes</i> sp. (n=4)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n=7)
Comprimento	246,4 (186-336)*	249,1 (211,8-288,1)	243,3 (214,7-267,9)	308,4 (268,2-397,4)
Largura	13,9 (10,47-19,07)	12,0 (9,6- 14,13)	15,3 (14,5-15,59)	18,4 (5,2-20,4)
Esôfago total	76,7 (59,84-95,19)	74,6 (56,09- 92,83)	68,0 (63,21-70,5)	78,4 (66,7-90,0)
Ânus	28,6 (17-38,32)	32,8 (19,38- 46,54)	23,0 (19,22-26,57)	33,0 (17,7-51,3)

* Os valores apresentados representam a média (mínimo - máximo)

5.2.1.4 Larva rhabditóide (L2).

Estas são morfologicamente semelhantes às larvas de primeiro estágio, com um esôfago ainda rhabditóide, porém mais alongado, e com a divisão entre bulbo e istmo menos evidente. A cavidade bucal é menos evidente que nas L1, o primórdio genital foi observado em poucas larvas, e esta também apresenta a cauda afilada e o corpo mais alongado, delgado e afilado. A análise morfométrica desta forma evolutiva está representada na Tabela 5 e Figura 2.

TABELA 5. Análise morfométrica das larvas rhabditóides (L2) de *Strongyloides ophidiae* (*Strongyloididae*) obtidas da coprocultura.

Variáveis (μm)	Animais		
	<i>Sibynomorphus mikanii</i> (n = 17)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n = 20)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n = 7)
Comprimento	458,0 (301,7-600,3)*	312,1 (226,3-547,2)	435,83 (316,2- 620,6)
Largura	20,3 (14,1-32,8)	14,4 (10,9-29,0)	18,8 (16,44-22,7)
Esôfago total	107,5 (77,0-134,9)	82,4 (40,9- 176,8)	122,1 (91,8-186)
Ânus	39,3 (23,5-56,3)	35,9 (12,9- 55,7)	47,4 (38,8-51,85)

* Os valores apresentados representam a média (mínimo - máximo)

5.2.1.5 Larva filarióide (L3).

As larvas de terceiro estágio são alongadas, mais delgadas que as de segundo estágio, com esôfago longo e do tipo filariforme, possuindo uma cauda afilada com a extremidade entalhada (Tabela 6 e Figura 2).

TABELA 6. Análise morfométrica das larvas L3 infectantes de *Strongyloides ophidiae* (Strongyloididae) obtidas da coprocultura.

Variáveis (μm)	Animais			
	<i>Sibynomorphus mikanii</i> (n = 30)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n = 30)	<i>Thamnodynastes sp.</i> (n = 5)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n = 7)
Comprimento	495,9 (407,6-664,3)*	486,4 (421,8-602,8)	576,6 (527,5-631,7)	599,6 (553,2-669,1)
Largura	14,7 (11,7-18,9)	14,9 (11,8-18,7)	18,6 (16,7-20,7)	19,1 (16-23,7)
Esôfago total	179,3 (98,95-289,2)	171,0 (111,8-254)	162,8 (114,2-268,0)	191,1 (144,5-290,6)
Ânus	48,6 (28,1-74,3)	63,0 (32,3-103,1)	61,1(53,1-75,2)	62,6 (55,4- 69,5)

* Os valores apresentados representam a média (mínimo - máximo)



FIGURA 2. Ovo e larvas de *Strongyloides ophidiae*. (A) ovo larvado; B) larva rhabditóide (L2); C) larva filarióide (L3); D) Detalhe da cauda entalhada da larva filarióide (L3). A-D, clarificação com fenol.

5.2.1.6. Fêmeas de vida-livre.

Possuem o corpo curto, com parede fina, e cutícula com finas estriações transversas. O esôfago é rhabditóide, curto, e a sua porção anterior (muscular) é separada do corpo por uma leve constrição. O anel nervoso se localiza na porção final do istmo esofagiano. O sistema reprodutor é didelfo e anfidelfo, com a vulva próxima ao meio do corpo e vagina curta. O corpo não apresenta constrição posterior à vulva, os lábios dessa são proeminentes; e útero com uma única fileira de ovos (Tabela 7 e Figura 3).

TABELA 7. Análise morfométrica de fêmeas de vida-livre e seus ovos de *Strongyloides ophidiae* (Strongyloididae) obtidos da coprocultura.

Variáveis (μm)	Animais	
	<i>Sibynomorphus mikanii</i> (n=8)	<i>Oxyrhopus guibei</i> (n=10)
Comprimento	847,0 (644,8-1008,9)*	826,1 (711,8-1089,1)
Largura	39,2 (25,0-46,0)	36,9 (30,2-52,9)
Esôfago total	142,7 (107,7-174,6)	149,3 (116,9-260,8)
Ânus	97,4 (75,5-122,8)	99,8 (93,86-108,7)
Distância vulva- extremidade posterior	432,2 (334,1-502,0)	412,7 (345,5-560,9)
Distância ânus- extremidade posterior	411,2 (314,4-502,9)	389,4 (289,3-448)
Ovos	(n = 42)	(n = 12)
Comprimento	42,0 (23,5- 63,5)	46,9 (34,15-51,4)
Largura	27,2 (17,2- 35,4)	29,7 (25,5-38,9)

* Os valores apresentados representam a média (mínimo - máximo)

5.2.1.7. Macho de vida-livre.

O único macho de vida livre encontrado neste estudo apresentou comprimento de 417,8 μm ; largura de 16,6 μm ; corpo cilíndrico, atenuado nas duas extremidades, sendo a posterior pontiaguda; o esôfago é do tipo rhabditóide, de comprimento total de 71,8 μm (bulbo e ístimo); apresenta dois espículos iguais que medem 33,5 μm de comprimento e um gubernáculo com 14,9 μm de comprimento; neste não foi possível a observação de papilas pré-anais nem papilas pós-anais (Figura 3).



FIGURA 3. Macho e fêmeas de vida livre de obtidos a partir da coprocultura. A) visão geral do macho de vida livre; B) Detalhe da região posterior – notar a presença do espículo; C) visão geral da fêmea de vida livre; D) detalhe da região da vulva e ovos da fêmea de vida livre.

5.3. Frequência dos parasitas encontrados.

Além da infecção por *S. ophidiae*, os animais encontraram-se parasitados por outros helmintos e protozoários; em um total de 52 (41,6%) animais. Destes 45 animais (36%) apresentaram infecções simples e sete (5,6%) infecções múltiplas.

Dentre esses parasitas a prevalência foi de 22,4% para nematódeos do gênero *Rhabdias* spp.; 5,6% para ovos larvados; 4% para ovos morulados; 0,8% para *Kalicephalus* spp.; 3,2% para ovos de cestódeos; 0,8% para o trematódeo *Haplometroides buccicola* 4,8% para *Trichomonas* spp.; 1,6% *Cyclospora* spp., 0,8% para larvas e 0,8% de coccídeos não identificados (Tabela 8, Figuras 4 e 5).

TABELA 8. Espécies de serpentes parasitadas, número de serpentes estudadas e quantidade de serpentes parasitadas e parasitas encontrados.

Serpente hospedeira	Serpentes estudadas	Serpentes parasitadas	Parasita
BOIDAE			
<i>Boa constrictor amarali</i>	9	3	<i>Rhabdias</i> spp., <i>Trichomonas</i> spp.
COLUBRIDAE			
<i>Dipsas indica</i>	3	0	-
<i>Echinerteron occipitalis</i>	2	2	<i>Rhabdias</i> spp.e <i>Trichomonas</i> spp.
<i>Erythrolampus aesculapii</i>	1	0	-
<i>Liophis</i> sp.	1	1	Ovos larvados
<i>Oxyrhopus guibeii</i>	17	10	<i>Rhabdias</i> spp., <i>Strongyloides ophidiae</i> , <i>Trichomonas</i> spp. e ovos larvados
<i>Phalotris lativittatus</i>	1	1	<i>Haplometroides buccicola</i>
<i>Philodryas patagoniensis</i>	6	3	<i>Rhabdias</i> spp.e <i>Kalicephalus</i> spp., ovos larvados, larvas
<i>Rachidelus brazili</i>	1	0	-
<i>Simophis rhinostoma</i>	1	0	-
<i>Spilotes pullatus</i>	2	1	<i>Rhabdias</i> spp.
<i>Sibynomorphus mikani</i>	6	2	<i>Strongyloides ophidiae</i> e <i>Rhabdias</i> spp.
<i>Thamnodynastes</i> sp.	1	1	<i>Strongyloides ophidiae</i>
<i>Waglerphis merremi</i>	3	2	<i>Rhabdias</i> spp., <i>Trichomonas</i> spp. e ovos morulados
ELAPIDAE			
<i>Micrurus corallinus</i>	1	0	-
VIPERIDAE			
<i>Bothrops alternatus</i>	2	1	Ovo larvado
<i>Bothrops jararaca</i>	5	4	<i>Rhabdias</i> spp., <i>Cyclospora</i> spp., Ovos larvados
<i>Bothrops moojeni</i>	1	0	-
<i>Bothrops neuwiedii</i>	3	1	<i>Rhabdias</i> spp.
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	59	16	<i>Strongyloides</i> e <i>Rhabdias</i> spp., ovos de cestódeos, ovos morulados, <i>Trichomonas</i> spp., <i>Cyclospora</i> spp. e Coccídeos

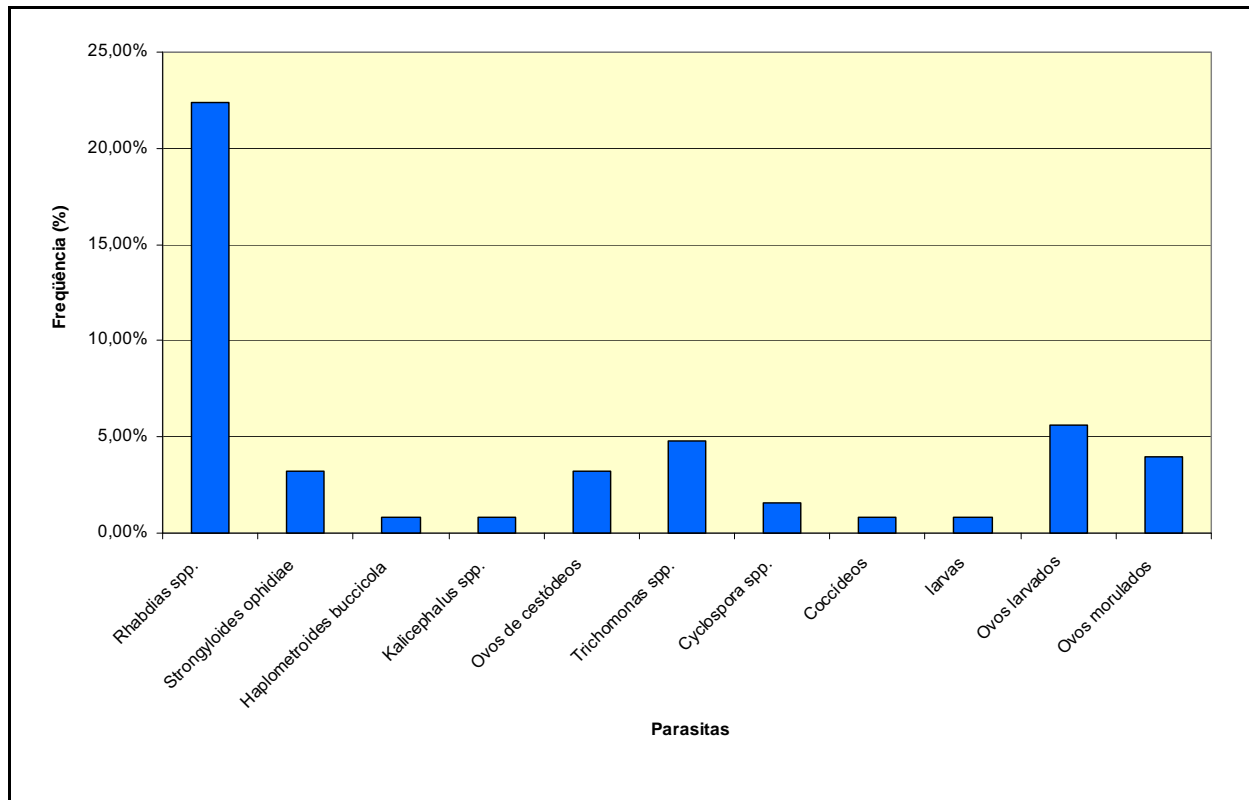


FIGURA 4. Frequência de parasitas encontrados nas serpentes incluídas no estudo.



FIGURA 5. Parasitas encontrados nas demais serpentes estudadas. A) ovo morulado; B) ovos de cestódeos; C) *Cyclospora* sp.; D) *Kalicephalus* sp.; E) *Rhabdias* sp.; F) *Haplometroides buccicola*, coloração por carmim clorídrico.

5.4. Caracterização molecular de *Strongyloides ophidiae*.

5.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os produtos amplificados pela PCR a partir de fêmeas partenogenéticas de *S. ophidiae* apresentaram aproximadamente 350 pares de base (Figura 6).

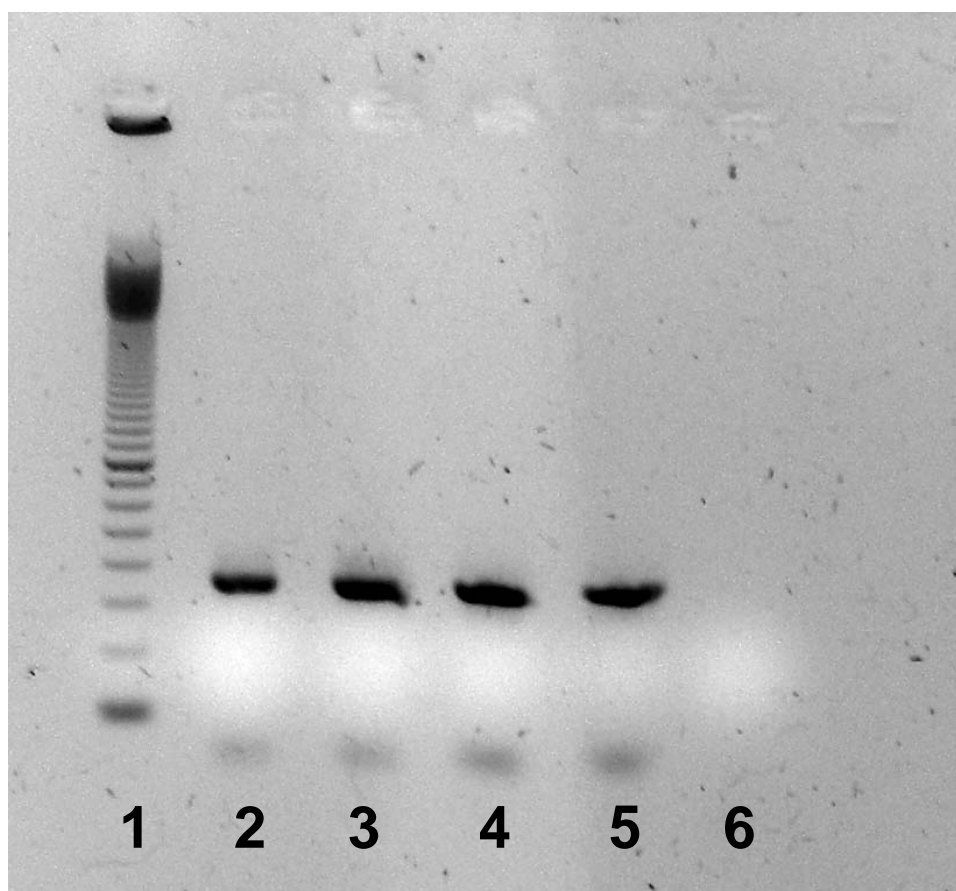


FIGURA 6. Fotografia do gel de agarose a 2% dos produtos amplificados pela PCR com o uso dos oligonucleotídeos SSUA e SSU22R (Dorris *et al.* 2002) de DNA extraído de um pool de 10 fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis* e pool de 8 fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides ophidiae*. Poço 1, marcador de tamanho molecular 100 pares de base (pb) (GE Healthcare Bucs, UK). Poços 2 e 3 (repetições), banda de amplificação de 350 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis*. Poço 4 e 5 (repetições), banda de amplificação de 350 pb a partir de amostras de DNA de *S. ophidiae*. Poço 6, reação contendo reagentes, sem adição de DNA.

5.4.2. Seqüenciamento.

A comparação entre espécie estudada com as seqüências de outras espécies de *Strongyloides* disponíveis no Genbank demonstrou diferenças em alguns nucleotídeos do fragmento seqüenciado (assinalado com asteriscos) (Figura 7).

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

S. stercoralis      TTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. fuelleborni     TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S.sp. ex snake     TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. procyonis       TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. f. kellyi       TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. papillosus p   TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. cebus           TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. venezuelensis  TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. suis            TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. ratti           TATTAACATGAAACCCAGAAAGCTCATWATVACAGCTATAGACTACACNGDTAAATAT
S. westeri        TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
S. ophidiae       TTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
Parastrongyloides TATCATACGTGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGT-AAATAT
Rhabditophanes    ACGTTCACGTGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAATTTACACGGC-AAATTC
Rhabdias bufonis  ATTTTATGGTTAAACTGCGAACGGCTCATTACAACAGCAATAATCAGCATG---AAGTTT
                    *  ****  *  *  *****  *  *****  **  **  **  *
    
```

```

S. stercoralis      TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTTATACCACATTAGTG
S. fuelleborni     TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTTATACCACATTAGTG
S. sp. ex snake     TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTTATACCACATTAGTG
S. procyonis       TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTTATACCACATTAGTG
S. f. kellyi       TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. papillosus p   TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. cebus           TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. venezuelensis  TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. suis            GTTAGTAGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. ratti           TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. westeri        TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTTATACCACATTAGTG
S. ophidiae       TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTACCTATACCACATTAGTG
Parastrongyloides TTTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTACATAAGCCACATTCGTG
Rhabditophanes    CCTAGTTGGATAAAGTGAAGTAATTCTTGAGCTAATACACGCAATCTAAGCCACATCCGTG
Rhabdias bufonis  TCCTTATGGATACTTGCAGTAATTCTGGAGMTMATAACAGTGTGACCTTCGGGTTTCATTT
                    *****  *  *****  **  *  *****  *  *  *
    
```

```

S. stercoralis      GTGCGTTTATTTGATTAACCATTATTTATATTGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. fuelleborni     GTGCGTTTATTTGATTAACCATTATTTATATTGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. sp. ex snake     GTGCGTTTATTTGATTAACCATTATTTATATTGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. procyonis       GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT-ATATTGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. f. kellyi       GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATT--
S. papillosus p   GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATT--
S. cebus           GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATT--
S. venezuelensis  GTGCGTGGATTTGATGAAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATT--
S. suis            GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. ratti           GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TTTCGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
S. westeri        GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--TATTGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
s. ophidiae       GTGCGTTTATTTGATTAACCATTT--GTTCGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
Parastrongyloides GTGCGTTTATTTGATTAACCATAAAT---AATGGTTGACTCAAAATATCCTCGCTGATT--
Rhabditophanes    GTGCGTTTATTTGATTAACACTAGAA---ATTGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGAAC--
Rhabdias bufonis  TTTAGATTCATAACCGGGATACCGTTGAGTGAT-GACTCTGATTA-CCTTGCAGACCGC
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
    
```

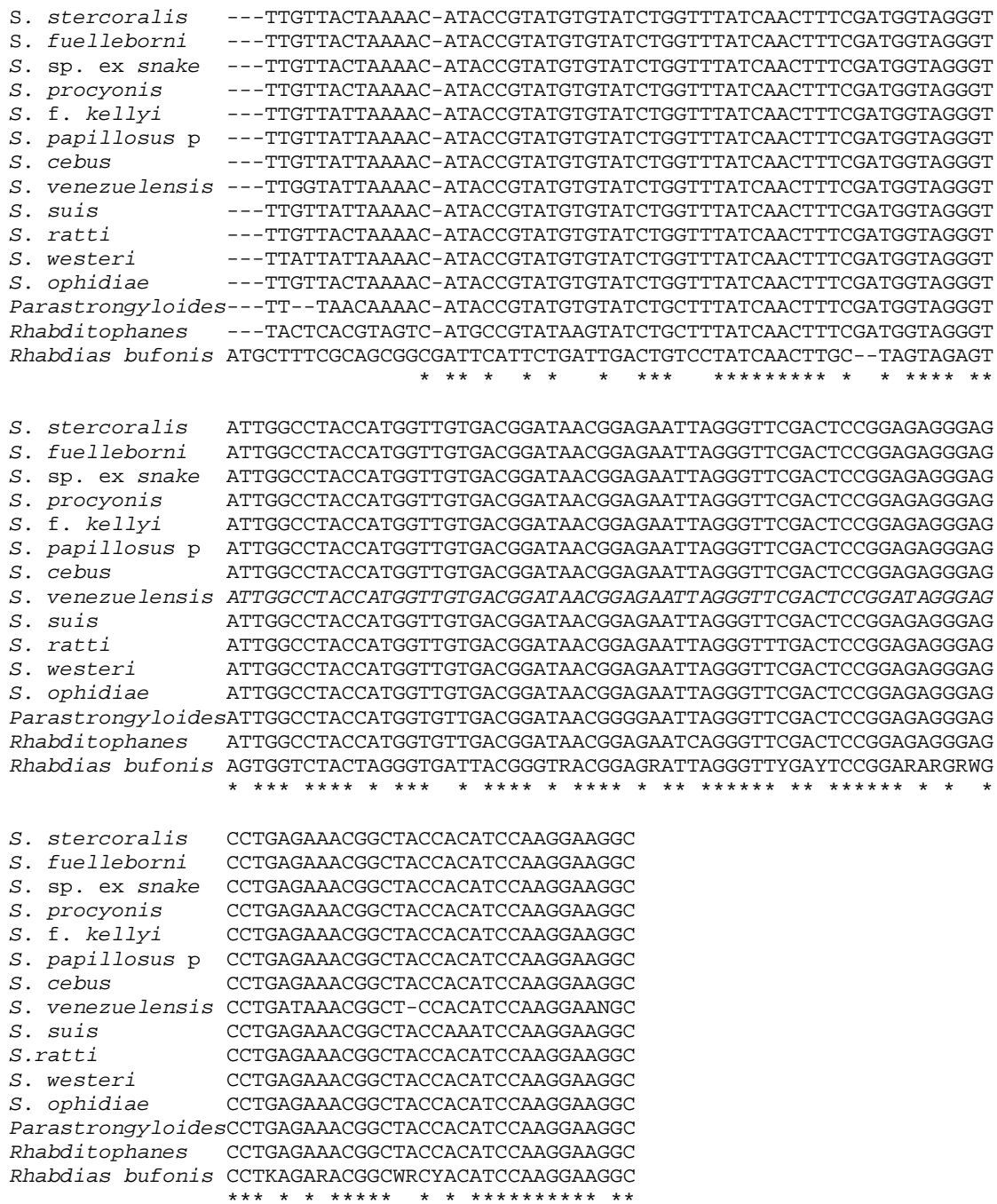


FIGURA 7. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Os sítios polimórficos são evidenciados pela ausência do símbolo (*). Os símbolos (-) representam a ausência de nucleotídeos (gaps).

5.4.3. Análise filogenética.

As seqüências de nucleotídeos isoladas desse nematódeo parasita de *O. guibei* (Genbank com número de acesso EU287935) apresentou 98% de identidade com *Strongyloides procyonis* (Genbank AB272234.1 e AB205054.1) e 97% identidade com *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. “ex snake” e *Strongyloides fuelleborni* (Genbank AB277236.1, AF279916.2, AJ417031.1 e AJ407030.1, respectivamente).

A análise da relação filogenética entre as espécies da família Strongyloidea e Rhabdiasidae demonstrou que embora apresente similaridade acima de 97% com outras espécies *S. ophidiae* foi alocado em um braço isolado da árvore filogenética (Figura 8).

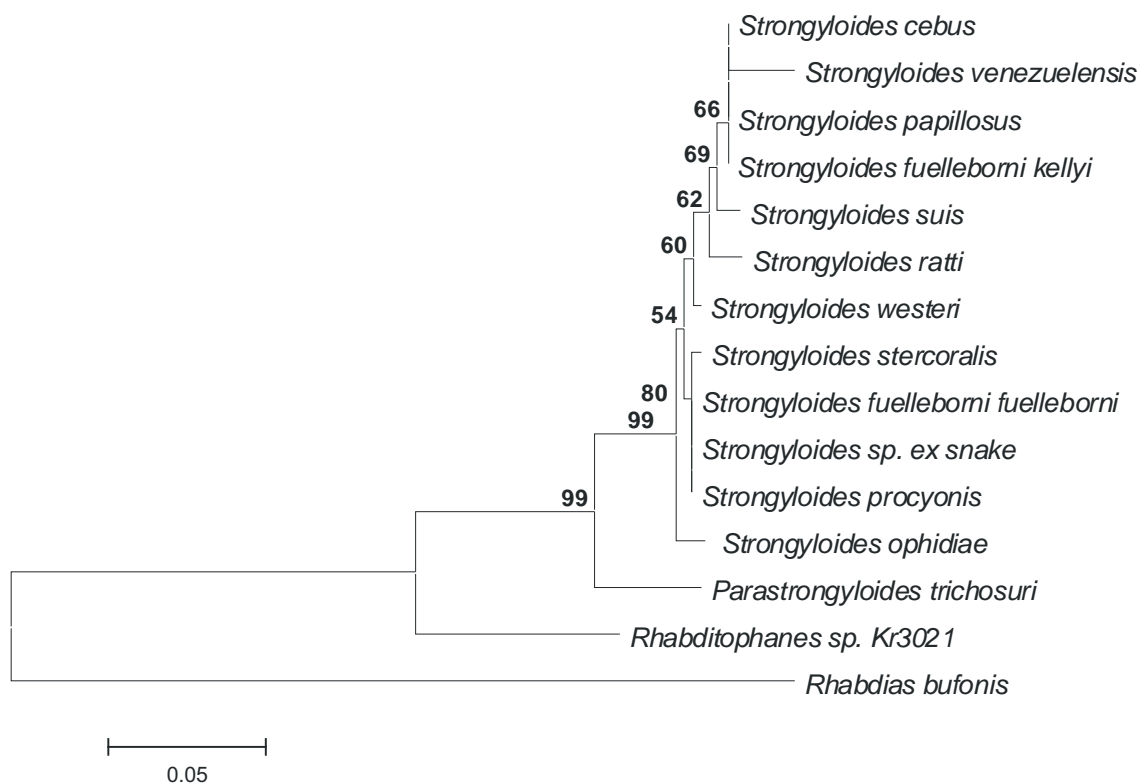


FIGURA 8. Relação Filogenética da família Strongyloidea comparada com a família Rhabdiasidae.

6. DISCUSSÃO

Existem poucos relatos sobre a ocorrência de espécies do gênero *Strongyloides* parasitas de serpentes. Até o momento, apenas quatro espécies foram descritas *S. ophidae* (PEREIRA, 1929), *S. mirzai* (SINGH, 1954), *S. serpentis* (LITTLE, 1966b) e *S. gulae* (LITTLE, 1966b).

S. ophidae, parasita de intestino de *M. bifossatus*, foi a única espécie descrita no Brasil, e mesmo assim, com base exclusivamente em fêmeas partenogênicas (PEREIRA, 1929). Nenhum outro estudo foi realizado para a caracterização dessa espécie. Sendo assim, o presente trabalho vem contribuir para a caracterização morfológica e molecular de *S. ophidae*, principalmente pelas descrições das formas de vida livre, ainda não descritas para a espécie, como também pelos aspectos moleculares abordados no estudo.

Nas fêmeas partenogênicas recuperadas de *O. guibei* o ovário apresentou-se espiralado em relação ao intestino, tanto anteriormente como posteriormente. Essa característica é semelhante aos achados de Little (1966b), no qual a espécie *S. serpentis*, estudada por esse autor, também apresentou um ovário duas vezes espiralado anteriormente e parcialmente espiralado posteriormente. Essa morfologia também se assemelha às das fêmeas parasitas descritas por Pereira (1929), denominada de *S. ophidae*. A fêmea parasita de *S. mirzai* descrita por Singh (1954) diferiu das fêmeas deste estudo, bem como de *S. ophidae* (PEREIRA, 1929), de *S. serpentis* (LITTLE, 1966b) e de *S. gulae* (LITTLE, 1966b), por apresentar ovário espiralado ao redor do intestino, com três voltas anteriormente e uma volta posteriormente.

Com relação à morfometria das fêmeas partenogênicas, *S. ophidae* apresentou comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago total e distância entre o ânus e a extremidade posterior maiores do que as espécies *S. serpentis* e *S. gulae*. A única variável em que estes nematódeos se assemelharam foi a distância entre a vulva e a extremidade posterior. Com relação aos ovos no interior do útero de *S. ophidae* apresentaram comprimento semelhante aos dos ovos de *S. serpentis* e *S. gulae*. Por outro lado, as larguras dos ovos de *S. serpentis* e *S. gulae*, foram menores que as de *S. ophidae*. Estes aspectos demonstram

claramente a identidade de *S. ophidiae*, baseadas nas suas características morfológicas e morfométricas.

Neste trabalho duas serpentes que se encontravam parasitadas por *S. ophidiae* eliminaram nas fezes ovos contendo larva de primeiro estágio, e segundo Little (1966a,b), o tipo de estágio de desenvolvimento eliminado nas fezes é um importante fator na identificação da espécie, o que permite concluir que este seja o padrão de eliminação de ovos por *S. ophidiae*, já que as fezes foram coletadas diretamente do hospedeiro e imediatamente analisadas. As medidas dos ovos apresentaram-se ligeiramente maiores que as medidas encontradas no trabalho de Pereira (1929) e apresentaram-se muito semelhantes aos valores encontrados por Rossellini *et al.* (2004) que relataram a presença de *S. ophidiae* nas serpentes *C. durissus terrificus* e *P. oífersii*. Não há descrição na literatura de medidas de ovos para as demais espécies de *Strongyloides* de serpentes.

Com relação às larvas de primeiro estágio, as características de esôfago rabaditóide e comprimento e largura do corpo encontrados neste trabalho são muito semelhantes às descrições realizadas para o gênero *Strongyloides*. Este estudo relata pela primeira vez a descrição de larvas de primeiro estágio em serpentes. Little (1966a,b) e Vieira *et al.* (2006) destacam a presença do primórdio genital neste estágio larval, foi observado em poucas larvas no presente estudo.

As larvas de segundo estágio, assim como as de primeiro estágio, não apresentaram morfologia e morfometria distintas do gênero *Strongyloides*, não havendo também relatos deste estágio em espécies parasitas de serpentes.

As larvas de terceiro estágio apresentaram comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago e cauda maiores que as encontradas nas serpentes estudadas por Little (1996b). A morfologia e morfometria das L3 encontradas não contribuíram para a confirmação da espécie de *S. ophidiae* por não haver estudos sobre esse estágio para esta espécie e por estas apresentarem características e dados morfométricos semelhantes às descritas para as outras espécies. Segundo Vieira *et al.* (2006) as L3 das diferentes espécies de *Strongyloides* podem apresentar diferenças entre si de comprimento total do corpo, mas esses autores acreditam que esta diferença não seja suficiente para a determinação da espécie.

Nas fêmeas de vida livre, a forma do útero e a disposição dos ovos em uma única fileira se assemelharam às descritas por Little (1966b) para *S. serpentis*, mas que também são indistinguíveis das características de *S. gulae*. Portanto, essa forma evolutiva também tem pouca contribuição para a identificação das espécies.

Apenas um macho de vida livre foi encontrado nas coproculturas, mas este apresentou a morfologia do espículo diferente das descrições da literatura para *S. serpentis* (LITTLE, 1966b), assemelhando-se a descrição realizada para as outras espécies de *Strongyloides*, e os dados morfométricos apresentaram-se próximos aos encontrados em *S. cruzi* (RODRIGUES, 1968; VICENTE *et al.*, 1993).

Tomados em conjunto, os dados morfológicos e morfométricos obtidos no presente estudo, principalmente das formas de vida livre, vêm acrescentar informações que contribuem sobremaneira para a caracterização de *S. ophidiae*.

Em relação à caracterização molecular, o único relato envolvendo *Strongyloides* em serpentes foi realizado por Dorris *et al.* (2002). Na PCR, o padrão de banda (350 pb) encontrado foi semelhante aos encontrados para os *Strongyloides* de serpentes estudadas por Dorris *et al.* (2002). Adicionalmente, no seqüenciamento do amplificado de amostras deste nematódeo, foi observado uma identidade de 97% entre *S. ophidiae* e *Strongyloides* sp. coletado de serpente. Todavia na árvore filogenética, essas duas espécies foram alocadas em ramos diferentes, destacando-se assim as diferenças genéticas entre elas.

Strongyloides ophidiae apresentou maior identidade genética (98%) com *S. procyonis*, parasita de *Procyon lotor* (SATO *et al.*, 2006). Apesar da proximidade genética entre essas duas espécies, morfologicamente estas apresentaram diferenças na forma do ovário. *Strongyloides procyonis* difere de *S. ophidiae* por apresentar o ovário liso e reto. A região genômica utilizada neste estudo é muito conservada por isso as espécies do gênero apresentam identidades muito próximas, mas essa pequena diferença já indica que a espécie em questão é diferente das anteriormente estudadas através de estudos moleculares. O presente estudo representa a primeira caracterização molecular de *S. ophidiae*, que somado às características morfológicas das formas parasitas e de vida-livre aqui descritas contribuem para a caracterização da espécie.

Neste estudo apenas quatro exemplares de serpentes, das espécies *O. guibei*, *S. mikani*, *Thamnodynastes* sp. e *C. durissus terrificus*, estavam parasitadas por *S. ophidiae*, indicando que a prevalência desta infecção na população de serpentes da região de Botucatu, São Paulo, é muito baixa (3,2%). Este é o único estudo realizado até o presente momento sobre prevalência deste nematódeo em serpentes. Os trabalhos da literatura se restringem ao relato de ocorrência no Brasil, tanto na descrição espécie (PEREIRA, 1929) como no relato de Rossellini *et al.* (2004), parasitando dois novos hospedeiros, as serpentes: *C. durissus terrificus* e *P. olfersii*.

Na Índia, Mirza (1935) encontrou serpentes *Ptyas mucosus*, parasitadas por *S. mirzai*, e relatou a ocorrência de infecções baixas (de 10 a 15 exemplares em um único hospedeiro) e altas (de 100 a 125 espécimes por hospedeiro) (SINGH, 1954). Little (1966) realizou estudos morfológicos de *S. gulae* e *S. serpentis* encontrados em *Natrix cyclopion cyclopion*, *N. taxispilota taxispilota*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *A. contortrix contortrix*, *Coluber constrictor flaviventris*, *Lampropeltis getulis holbrooki* e *Heterodon platyrhinos platyrhinos*, mas não relata sua prevalência nesses animais. Holt *et al.* (1979) reportaram três casos de infecção pelo nematódeo *Strongyloides* sp. em serpentes, *Python reticulatus*, *Elaphe obsoleta quadrivittata* e *Elaphe obsoleta obsoleta*. O relato de Holt *et al.* (1979) foi baseado em achados de ovos e larvas de *Strongyloides* nas fezes destas serpentes, e em dados histopatológicos do intestino delgado, pulmões e pâncreas.

Dos diferentes substratos testados, aquele que favoreceu a maior recuperação de larvas foi o carvão ativado em grãos, mas a maior parte das coproculturas deste estudo foi realizada em papel de filtro, devido à escassez do carvão ativado em grãos. Além dos diferentes tipos de substratos, foram testadas diferentes temperaturas, para cada substrato. Os melhores resultados foram obtidos com a temperatura ambiente para fezes eqüinas esterilizadas e xaxim autoclavado. No caso da cultura com carvão, a temperatura de 27° C e 80% de umidade propiciou os melhores resultados. O método do papel de filtro forneceu resultados satisfatórios nas duas condições de temperatura. Não foi possível chegar à identificação de alguns ovos ou larvas encontrados nos exames coproparasitológicos, pois os

resultados das coproculturas foram negativos. Além disso, algumas coproculturas resultaram em pequenas quantidades de larvas.

Além de *S. ophidiae* os animais encontravam-se parasitados por outros helmintos e protozoários, sendo *Rhabdias* spp. (22,4%) o parasita mais encontrado, corroborando com outros trabalhos como o de Silva *et al.* (2001), que estudando a frequência de nematódeos em 24 exemplares de serpentes *C. durissus terrificus* no cativeiro, encontraram parasitas no estômago (16,7%), intestino (12,5%) e pulmão (70,8%). A prevalência de *Rhabdias* spp. em serpentes *C. durissus terrificus* procedentes da região foi de 44%. (SILVA *et al.*, 2008). Araujo *et al.* (1999) ao necropsiarem alguns espécimes *C. durissus terrificus* e *Bothrops alternatus*, mantidas em cativeiro, encontraram helmintos dos gêneros *Rhabdias*. Grego (2000) estudou 138 ofídios da espécie *B. jararaca*, provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo e identificou diversos parasitas e dentre eles o nematódeo da espécie *Rhabdias vellardi* na porcentagem de 34%. Dias *et al.*(2004), encontraram prevalência de 33,3% de *Rhabdias labiata* em *C. durissus terrificus*. Santos *et al.* (2006) relataram prevalência de 31,6% de *Rhabdias* spp. em serpentes da espécie *C. durissus terrificus*. Assim como em outros estudos, dentre os helmintos que parasitam serpentes, tem sido observada uma alta prevalência de nematódeos do gênero *Rhabdias*.

Kalicephalus sp. foi encontrada neste estudo em *Philodryas patagoniensis* (0,8%). Vicente *et al.* (1993) relataram a presença de *Kalicephalus* spp. infectando inúmeras espécies de serpentes das famílias Boidae, Colubridae e Viperidae, demonstrando que este também é um parasita muito comum em serpentes. Este nematódeo foi relatado no trabalho de Araújo *et al.* (1999) e no estudo realizado por Grego (2000), que encontrou 27,5% das serpentes *B. jararaca*, parasitadas por *K. costatus* e *K. inermis*. Em *C. durissus terrificus*, foi observado prevalência de 58,3% de *K. inermis inermis* e 33,3% de *K. costatus inermis* (Dias *et al.*, 2004) e também de 5,3% por *Kalicephalus* spp (Santos *et al.*, 2006).

Trichomonas sp. foi encontrada parasitando seis exemplares de serpentes: duas *B. constrictor amarali*, *E. occipitalis*, *O. guibeii*, *W. merremi* e *C. durissus terrificus*, com prevalência de 4,8%. Este protozoário foi descrito pela primeira vez no Brasil por Vilela *et al.* (2003) em intestino de *B. jararaca*. Neste mesmo trabalho são

citadas ocorrências de tricomonídeos em *Eunectes murinus* e outras serpentes da África e Índia.

Cyclospora sp. também foi encontrada neste trabalho numa porcentagem de 1,6%. Este protozoário foi anteriormente relatado em serpentes *Coluber scalaris*, *Coronella austriaca*, *Natrix viperinus*, *Vipera aspis*, *Natrix natrix*, *Natrix stolata* e *Ninia sebael*. No Brasil foi descrita a espécie de *C. schneideri* na serpente *Anylius scytale scytale* (LAISON, 2005).

Haplometroides buccicola foi encontrada numa porcentagem de 0,8% em *P. lativittatus*. Este trematódeo foi descrito a partir de exemplares coletados em *Micrurus* sp. no Paraguai (ODHNER, 1911 *apud* SILVA *et al.* 2007). Posteriormente, foram relatados em *Epicrates cenchria crassus*, *Micrurus frontalis*, *Leptotyphlops koppesi*, *Phalotris lativittatus* (SILVA *et al.*, 2007) e *Micrurus corallinus* (SANTOS *et al.*, 2008).

A literatura sobre helminto de serpentes brasileiras é rica, porém há ainda muito que se conhecer visto que a maioria das espécies de ofídios brasileiros não foram estudados. Este estudo demonstrou a presença de vários parasitas nas serpentes avaliadas. Ressaltando que para *S. ophidiae*, não se conhecia nenhuma informação sobre sua prevalência, que os nossos achados demonstraram ser muito baixa e sugerem que novos estudos devam ser conduzidos para o melhor conhecimento da fauna parasitária de serpentes.

6. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia proposta e a forma de análise empregada para a caracterização morfológica e molecular de *S. ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae) parasita de serpentes no Brasil é possível concluir que:

1. As características morfológicas das formas de vida livre vêm acrescentar informações que contribuem sobremaneira para a caracterização de *S. ophidiae*.
2. Os diferentes aspectos morfológicos e morfométricos da fêmea partenogenética demonstram claramente a identidade de *S. ophidiae*.
3. *S. ophidiae* apresenta característica molecular que o diferiu das demais espécies de parasitas de serpentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹.

1. ALFIERI, F. Intorno allá genesi della “*Anguillula intestinalis*” della rana. **Giorn. R. Accad. Med. Torino.**, v.14; p.265-267, 1908.
2. 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.
3. BAKER, M.R. Nematode Parasitism in amphibians and reptiles. **Can. J. Zool.**, v.6, p.747-757, 1983.
4. BAVAY, A. Sur l’anguillule intestinale (*Anguillula intestinalis*), nouveau ver nematóide trouvé par le Dr. Normand chez lês malades atteints de diarrhéee de Cochinchine. **Compt. Rend. Sci. Biol.**, v.84, p.266-268, 1877.
5. BAYLIS, H.A. Report on a colletion of parasitic nematodes, mainly from Egypt. Part III. Camallinidae, etc. with a note on *Prostmayria* and an appendix on Acanthocephala. **Parasitol.**, v.15, p.24-38, 1923.
6. BORGES, R.C. *Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em casos de acidentes*. São Paulo, 1999.
7. DIAS, R. J. P.; ALMEIDA, S. J. B.; PRIETO, D. B.; LIMA, S. S. Aspectos ecológicos dos nematóides parasitos de *Crotalus durissus terrificus* Laurenti, 1768 (Ophidia, Viperidae), em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev. bras. Zociências**, v.6, n.2, p.231-235, 2004.
8. DORRIS, M.; BLAXTER, M. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides stercoralis*. **Intern. J. Parasitol.**, v.30, p.939-941, 2000.
9. DORRIS, M.; VINEY, E. M.; BLAXTER, L. M.; Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Intern. J. Parasitol.**, v.32, p.1507-1517, 2002.

¹ 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.

10. GRASSI, G.B. *L'Anguillula intestinalis*. Nota preventiva. **Gazz. Med. Ital. Lomb.**, v.5, p.471-474, 1878.
11. 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 da Universidade de São Paulo, São Paulo.
12. GROVE, D. I. **Strongyloidiasis: A major roundworm infection in man**. London, New York, Philadelphia: Taylor & Francis. 1989. 336p.
13. HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, p.33-39, 1987.
14. HARVEY, S.C.; VINEY, M.E.; Sex Determination in the Parasitic Nematode *Strongyloides ratti*. **Gen. Soc. Am.**, v.158, p.1527-1533, 2001.
15. HOLT, P.E.; COOPER, J.E.; NEEDHAM, J.R. *Strongyloides* infection in snakes: three case reports. **Vet. Rec.**, v.10, p.213-214, 1979.
16. KLINGENBERG, R. J. **Understanding reptiles parasites**. Califórnia: Advanced Vivarium Systems, 1993. 83p.
17. KLINGENBERG, R. J. Reptilian parasite testing. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B.Saunders, 2000. p.486.
18. KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN; I.B.; NEI. M. **MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics.**, v.17, n.12, p.1244-1245, 2001.
19. LAISON, R. The genus *Cyclospora* (Apicomplexa: Eimeriidae), with a description of *Cyclospora schneideri* n. sp. in the snake *Anilius scytale scytale* (Aniliidae) from Amazonian Brasil- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.100, n.2, p.103-110, 2005.
20. LANE, T. M.; MADER, D. R. Parasitology. In: MADER, M. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., p.277-281, 1996.

21. LITTLE, M.D. Comparative Morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **J. Parasitol.**,v.52, n.52, p.69-84, 1966a.
22. LITTLE, M.D. Seven New Species of *Strongyloides* (Nematoda) From Louisiana. **J. Parasitol.**, v.52, n.52, p.85-97, 1966b.
23. LOSS, A. The anatomy and life history of *Agchylostoma duodenale* Dub. A monograph. Part II. The development in the free state. **Rec. Egypt. Govt. School Med.**, v.4, p.159-613, 1911.
24. MADER, M. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., p.277-281, 1996.
25. MIRZA, M.B.; SINGH, S.N. “*Strongyloides akbari* n. sp. A new nematode parasite from *Crocidura coerulea*, with a note on some species of the genus *Strongyloides*”. **Proc. Indian Acad. Sci.**, v.2, p.503-507, 1935.
26. NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitoses emergentes. Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.
27. PEREIRA, C. *Strongyloides ophidiae*. **Bol. Biol.**, v.15, p.16-17, 1929.
28. REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856p.
29. RODRIGUES, O.H. Sobre nova espécie do gênero *Strongyloides* Grassi, 1879 (Nematoda, Rhabdiasoidea). **Atas Soc. Biol.**, v.12, p.31-32, 1968.
30. ROSSELLINI, M.; SANTOS, K. R.; BARELLA, T. H.; SILVA, R. J. Ocorrência de *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae) em *Crotalus durissus terrificus* (Serpente, Viperidae) e *Philodryas olfersii* (Serpentes, Colubridae). In: VII Semana da Bio, realizada no Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, **Proceedings**...Botucatu: São Paulo, 2004.
31. SANTOS, K. R.; BARRELLA, T. H.; SILVA, R. J. Frequência de Endoparasitoses em Serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) In: 14° Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2° Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. **Proceedings**... Ribeirão Preto, 2006. p.390.
32. SANTOS, K. R., BARRELLA, T. H., ZICA, E. O. P., SILVA, R. J. New Reports on the parasitism by *Haplometroides buccicola* (Digenea, Plagiorchiidae) in

- snakes from Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v.60, n.2, 2008. In press.
33. SATO, H.; SAUZUKI, K.; OSANAI, A.; KAMYIA, H.; FURUOKA, H. Identification and characterization of the threadworm, *Strongyloides procyonis*, from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. **J. Parasitol.**, v.92, p.63-68, 2006.
34. SILVA, R.J. **As serpentes**. Jaboticabal: Funep, 2000. 141p.
35. 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.
36. SILVA, R.J.; FERREIRA, V.L.; STRÜSSMAN, C. New species of *Haplometroides* (Digenea: Plagiorchiidae) from *Phalotris nasutus* (Gomes, 1915) (Serpentes, Colubridae). **J. Parasitol.**, v.93, n.4, p.917-921, 2007.
37. SILVA, R.J.; Frequency of rhabdiasid nematodes in wild *Crotalus durissus terrificus* (serpentes, viperidae) from Botucatu region, São Paulo state, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.13, n.1 p.122-129, 2008.
38. SINGH, S.N. Studies on The Morphology and Life-History of *Strongyloides mirzai* n.sp. from Snakes in India. **J. Helminth.**, v. 28, n.1/2, p.25-34, 1954.
39. THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.C. CLUSTAL X: windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Acids Res.**, v.24, p.4876-4882, 1997.
40. VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R.M. Nematódeos do Brasil. Parte V: Nematódeos de anfíbios. **Rev. Bras. Zool.**, v.7, p.452-683, 1990.
41. VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R.M. Nematódeos do Brasil. Nematódeos de répteis. Parte III: **Rev. Bras. Zool.**, v.10, p.1-183, 1993.

42. VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R.M. Nematódeos do Brasil. Nematódeos de aves. Parte IV: **Rev. Bras. Zool.**, v.12, p.1-273, 1995.
43. VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R.M. Nematódeos do Brasil. Parte V: Nematódeos de mamíferos. **Rev. Bras. Zool.**, v.14, n.1, p.1-452, 1997.
44. VIEIRA, F. M.; LIMA, S. S.; BESSA, E.C.A. Morfologia e Biometria de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linneus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae) no município de Juiz de Fora, Minas gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.1, p.7-12, 2006.
45. VILELA, F.C.; SILVA, M.G.; BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J. Trichomoniasis in *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v.9, n.1, p.105-110, 2003.
46. WALLACH, J. D., BOEVER, W. J. Reptiles and amphibians. In: ____. **Diseases of exotic animals: medical and surgical management**. Philadelphia: Saunders., p.979-1047, 1983.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Strongyloides ophidiae* (NEMATODA, RHABDIASIDAE).

**Karina Rodrigues dos Santos; Bianca Cechetto Carlos; Karina dos Santos Paduan;
Samir Moura Kadri; Thomaz Henrique Barrella; Mônica Regina Vendrame
Amarante; Paulo Eduardo Martins Ribolla; Reinaldo José da Silva[✉]**

[✉]Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-000, Phone: +55-14-38116239, Fax: +55-14-38153744, e-mail: reinaldo@ibb.unesp.br

ABSTRACT

The aim of the study is to report morphological data concerning parasitic females, rhabditoid and filarioid larva, free-living female forms, eggs and a molecular DNA analysis from a pool of eight *Strongyloides ophidae* parasitic females. These samples were obtained in the small intestine of *Oxyrhopus guibei* (Serpentes, Colubridae) collected in Lençóis Paulista city, State of São Paulo, Brazil. DNA amplification by PCR resulted in a 350 base-pair (bp) band for samples containing *S. ophidae* and *S. venezuelensis* DNA. *S. ophidae* nucleotide sequence analysis showed 98% identity with *Strongyloides procyonis* and 97% with *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides fuelleborni* and another *Strongyloides* sp. ex. snake.

Key-words: *Strongyloides ophidae*, Nematode, *Oxyrhopus guibei*, snakes.

INTRODUCTION

The genus *Strongyloides* Grassi, 1879 includes 52 nematode species parasite of vertebrates. Domestic mammals including cats, dogs and farm animals such as bovine, sheep and swine are the main host for *Strongyloides* spp. Few species of *Strongyloides* have been reported in amphibians, reptiles and birds (Grove, 1989; Dorris et al., 2002).

In Brazil, *Strongyloides ophidiae* Pereira, 1929 and *Strongyloides cruzi* were reported infecting reptiles. The former was described in a snake *Mastigodryas bifossatus* Raddi, 1820 (Pereira, 1929) and, the second, in a *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnès, 1818, gecko (Rodrigues, 1968).

Pereira (1929) described *S. ophidiae*, but only parasitic females and the eggs were analyzed in the species description. Since then, no other *S. ophidiae* report was published. Rhabditoid and filarioid larvae as well as free-living male and female forms of this nematode were not studied.

Recently, molecular studies have been accomplished for characterization of *Strongyloides* spp. (Dorris e Blaxter, 2000; Dorris et al., 2002). However, those studies did not include snakes *Strongyloides* species from Brazil.

In the present study are presented morphological and molecular data of *S. ophidiae* collected from the *Oxyrhopus guibei* snake Duméril & Bibron Duméril, 1854.

MATERIAL AND METHODS

Source of nematode materials

The study was performed with one adult female specimen of *Oxyrhopus guibei* snake from the municipality of Lençóis Paulista, São Paulo State, Brazil and that was donated to the

Center for the Study of Venous and Venomous Animals of São Paulo State University (CEVAP/UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Parasitological exams

Parasitological exams revealed the presence of embrionated eggs and their morphology was characteristic to the genus *Strongyloides*. Additionally, snake feces culture was accomplished in order to obtain the L3 larvae to confirm the *Strongyloides* presence. Snake feces samples were cultivated in sterilized paper filter on petri dish and maintained in incubator at 25°C and 80% humidity, during seven days, to obtain L1, L2, L3 stages and also free-living female forms (Hoffmann, 1987).

Parasitic females, eggs, rhabditoid and filarioid larvae, and free-living forms were analyzed in an image analysis computerized system (Qwin Lite 3.1, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The voucher specimens were deposited in the Coleção Helminológica de Referência (CHIBB) in Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, at Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu city, São Paulo state, Brazil.

DNA extraction, polimerase chain reaction (PCR)

DNA samples were extracted from a pool of eight *Strongyloides ophidiae* parasitic females and a pool of ten *Strongyloides venezuelensis* parasitic females fixed in 70% ethanol, using kit Quiamp (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Samples were eluted in 100 µl of TE buffer and 2 µl were used for PCR amplification.

A SSU rDNA gene segment was amplified by PCR using SSUAF primer (5'- AAA GAT TAA GCC ATG CAT G -3') and SSU22R primer (5'-GCC TGCTGC CTT CCT TGG

A-3') according to Dorris et al. (2002). Amplification was carried out in a 10 µl reaction, 10 mM Tris-HCl 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3, 100 µM each dNTP, 0.2 µM of each primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (GE Healthcare, Bucks, U.K.)

PCR reactions were performed on My cycler Thermal Cycler Bio-Rad[®] (T Gradient) and were conducted by 35 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 58,1°C and 30 s at 72°C) preceded by 95°C for 5 min and followed by a 7 min at 72°C. PCR products were visualized by ethidium bromide (0.5 µl/ml) staining after electrophoresis in a 2% agarose gel using a horizontal cube Hoefer HE 99 (GE Healthcare, Bucks, U.K.) in solution of TAE 1X (Tris base 0.4 M; acetic acid 0.20 M and EDTA 0.5 M solution, pH 8.0).

DNA Sequencing

PCR primers and dNTPs were removed before sequencing: 5 µl of PCR products was incubated with 1 µl of ExoSapIT (GE Healthcare, Bucks, U.K.) for 45 min at 37°C, followed by 20 min at 80°C for enzyme inactivation. Amplified fragments were sequenced in both forward and reverse direction by using ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. For each sequencing reaction approximately 10 ng of purified DNA, was combined with 3.2 pmol of primer (sense and/or reverse) used in the amplification reaction. Nucleic acid sequence analysis was performed on an automated Applied Biosystems 377 DNA sequencer.

Nucleic acid sequences analysis was performed using MERGER package software (<http://bioweb.pastuer.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) used for to produce the consensus sequence of each DNA sample. Sequences were aligned with the CLUSTAL X software, version 1.81 (Thompson et al. 1997). To obtain a better alignment, both pairwise and multiple alignments parameters were changed from the default set. Divergences were estimated by the

pairwise alignment using MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al., 1994). Distance method (Neighbour-joining/NJ) was used in construction of the phylogenetic tree (Saitou e Nei, 1987). The bootstrap test was applied to estimate the confidence of branching patterns of the neighbor-joining tree (Felsenstein, 1985).

RESULTS

Morphological characterization of *S. ophidae*

The parasitic females (n = 10)

Parasitic females presented slender body, 4700.3 (3524.8-5371.8) μm long and 50.6 (41.2-57.9) μm wide, ending with a conic tail, 105.3 (63.77-123.8) μm long. The anterior extremity is truncated and presents the stoma, however detail of this structure were not observed. Oesophagus is long, filariform, 1632.6 (1425.8-1902) μm long. Nerve ring was not observed. Reproductive system is didelphic and amphidelphic; the distance of the anterior genital to the oesophagus was 235.1 (102.6-374.1) μm and posterior genital branch to the posterior extremity was 328.1 (130.4-604) μm . The vulva is located on the mid-ventral of the body. The distance of vulva to posterior extremity was 2292.5 (1759.4-2620.4). The anterior ovary presented spiraled twice around intestine and the posterior ovary making a partial spiral. The posterior ovary extends to almost the anal opening. The uterus is short, containing a single row of eggs (2 to 5), which measure (n = 57) 51.8 (48.4-54.5) μm long e 32.4 (30.5-33.6) μm wide (Figure 1A-C).

Eggs found in feces (n =7)

Eggs found in the feces were lightly smaller than the eggs in the uterus of the parasitic female. They were elliptic, embryonated and with a thin shell, 44.5 (30.6- 51.03) μm long and 30.8 (25.55- 39) μm wide (Figure 1D).

First-stage larvae (L1) (n = 20)

First-stage larvae presented total length of 249.1 (211.8-288.1) μm and wide of 12.0 (9.6-14.1) μm . Rhabditiform oesophagus, with body, isthmus, and bulb, with total length of 74.6 (56.1-92.8) μm and an inconspicuous nerve ring involving the isthmus area was presented. A narrowly tapered tail, with 32.8 (19.4-46.5) μm was observed (Figure 1E).

Second-stage larvae (L2) (n = 20)

These were morphologically similar to the first-stage rhabditoid larvae, however the body was longer and thinner, 312.1 (226.3-547.2) μm long and 14.4 (10.9-29.0) μm wide. Oesophagus is still rhabditoid, however more extended and with a less evident division between bulb and isthmus, 82.4 (40.9-176.8); buccal cavity was less evident than in L1, the genital primordium was not visible, and also presents a thin tail, 35.9 (12.9-55.7) μm (Figure 1F).

Third-stage filarioid larvae (n = 30)

The infective third-stage larvae was elongated, thinner than second-stage rhabditoid larvae, and presented 486.4 (421.8-602.8) μm long and 14.9 (11.78-18.7) μm wide, with a long and filariform oesophagus, with 171.0 (111.8-254) μm long, possessing a thin tail, with truncated and notched tip, 63.0 (32.3- 103.1) μm long (Figure 1G-H).

Free-living females (n = 10)

Free-living females showed a small body, with 826.1 (711.8-1089.1) μm long and 36.9 (30.2-52.9) μm wide and a thin cuticle with fine transverse striations. Rhabditoid oesophagus presented a short constriction between the anterior portion and bulb area with 149.3 (116.9-260.8). Nerve ring was located at posterior end of esophageal isthmus. Reproductive system

was didelphic and amphidelphic, vulva was in the middle of the body, vagina was very short. The distance between vulva and anterior extremity was 412.7 (345.5-560.9) μm and 389.4 (289.3-448) μm was measured from the vulva to the posterior extremity. The body didn't show a constriction behind vulva that had prominent lips; one single row of eggs is found in the uteri. Eggs were 46.9 (34.15- 51.4) μm long and 29.7 (25.5-38.9) μm wide. The tail measured 99.8 (93.86-108.7) μm long (Figure 1I).

Free-living males

Free-living males were not found.

Molecular characterization of *Strongyloides ophidae*.

A 350 base-pair (bp) amplification band was obtained by PCR using two DNA samples of each species. Lanes 2 and 3 show a 350 bp amplification band from each DNA sample of *S. venezuelensis*, and Lanes 4 and 5, the same band using two DNA samples from *Strongyloides ophidae* (Figure 2). The *Strongyloides ophidae* nucleotide sequence (Genbank accession number EU287935) isolated from *O. guibei* presented 98% identity with *Strongyloides procyonis* (Genbank accession number AB272234.1 and AB205054.1) and 97% identity with *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. ex snake and *Strongyloides fuelleborni* (Genbank accession number AB277236.1, AF279916.2, AJ417031.1 and AJ407030.1, respectively).

The phylogenetic relationship analysis among species of the families Strongyloididae and Rhabdiasidae families demonstrated *S. ophidae* was allocated in an isolated branch of the

phylogenetic tree, although have presented 97 to 98 % similarity relationship with several species (Figure 3).

DISCUSSION

There are few reports on the occurrence of *Strongyloides* spp. infecting snakes and until now only four species, *S. ophidae* (Pereira, 1929), *S. mirzai* (Singh, 1954), *S. serpentis* (Little, 1966) and *S. gulae* (Little, 1966) were described.

Strongyloides ophidae was described in the intestine of a *M. bifossatus* snake from Brazil, but just the parasitic females were analyzed for the species description (Pereira, 1929). No other studies were accomplished with *Strongyloides* spp. from Brazilian snakes. The present work contributes to morphological characterization of *S. ophidae*, mainly with free-living forms description, as well as to knowledge of this nematode molecular aspects. The parasitic females recovered from *O. guibei* presented ovary spiraled around the intestine in the anterior and posterior regions, as reported for *S. serpentis* by Little (1966). According to this author, *S. serpentis* presents an ovary twice spiraled anteriorly and occasionally making partial spiral the posterior region. This characteristic also resembled the parasitic females of *S. ophidae* described by Pereira (1929). On the contrary, the parasitic female of *S. mirzai* (Singh, 1954) differs of *S. ophidae* (Pereira, 1929), *S. serpentis* (Little, 1966) and *S. gulae* (Little, 1966) for presenting ovary with three spirals around the intestine anteriorly and one spiral posteriorly.

Regarding parasitic females morfometry, *S. ophidae* possessed body length and width, oesophagus length and tail larger than presented in *S. serpentis* and *S. gulae*. The only resemblance among these nematodes was the distance between the vulva and posterior extremity. The eggs into the uterus of *S. ophidae*, *S. serpentis* and *S. gulae* presented similar

length. On the other hand, the eggs width *S. serpentis* and *S. gulae* was smaller than *S. ophidiae*'s. These morphological and morphometric data clearly demonstrate the identity of *S. ophidiae*.

According to Little (1966), eggs development stage found in feces is an important factor for species identification. *O. guibei* feces were collected directly from host and immediately analyzed. Because all analyzed eggs were cleavage we can conclude that *S. ophidiae* eggs in feces contain first stage larvae.

Eggs measured in the present study were lightly larger than the ones described by Pereira (1929) but were very similar to *S. ophidiae*'s in *Crotalus durissus terrificus* and *Philodryas olfersii* snakes (Rossellini et al., 2004).

The first-stage larvae presented rhabditoid oesophagus and body length and width were very similar to the descriptions for *Strongyloides* spp. However, this is the first report of *Strongyloides* first-stage larvae in snakes. Little (1966) and Vieira et al. (2006) detach the importance of the genital primordium characterization in this larvae stage, but this was observed in a few larvae the present study.

The second-stage rhabditoid larvae as well as the first-stage larvae, did not presented distinct morphology and morphometry in comparison with *Strongyloides* spp., but they have not been previously reported in snakes either.

S. ophidiae third-stage larvae morphology analysis showed that the body length and width, oesophagus length, and tail length were larger than snakes *Strongyloides* species' studied by Little (1966). However, these different morphology and morfometry did not contribute to the *S. ophidiae* identification for two reasons: there were no morphological studies about that larvae stage in this species. The other reason is *Strongyloides* spp. L3 larvae

can present differences in body length which are not enough for the species identification, according to Vieira et al. (2006).

In free-living female forms, the uteri morphology and eggs disposition (in a single row) resembled *S. serpentis* and *S. gulae*'s (Little, 1966). Therefore, *Strongyloides* free-living female form also brings little contribution to be used to distinguish among species.

Morphological and morfometric data obtained in the present study, concerning mainly free-living forms, contribute to the better characterization of *S. ophidiae*, since just the parasitic female was described (Pereira, 1929).

Molecular data about *Strongyloides* species were provided exclusively by Dorris et al. (2002). The amplified 350 bp band presented in this study is similar to that found in *Strongyloides* ex. snakes by Dorris (2002), but DNA sequencing analysis showed 97% identity among *S. ophidiae* and *Strongyloides cebus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. ex snake and *Strongyloides fuelleborni*. In the neighbor-joining phylogenetic tree *Strongyloides procyonis*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides* sp. ex snake and *Strongyloides fuelleborni* were allocated in the same branche. On the other hand *S. ophidiae* was allocated in a distinguished branch, reinforcing the genetic differences among them.

Strongyloides ophidiae presented larger genetic identity (98%) with *Strongyloides procyonis* from *Procyon lotor* (raccoon) (Sato et al., 2006). In spite of the genetic proximity between these species, *S. procyonis* differs of *S. ophidiae* for presenting the straight ovaries (Little, 1966). The genomic region analyzed in this study is very conserved in the genus *Strongyloides* that explains the close identity between *S. ophidiae* and *S. procyonis*.

This study presents the first molecular analysis in addition with morphological and morphometric data from parasitic and free-living forms of *S. ophidiae* providing a significant contribution to the species characterization.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 06/50968-8) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- DORRIS, M. AND M. BLAXTER. 2000. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides stercoralis*. *Internacional Journal for Parasitology* **30**: 939-941.
- DORRIS, M.; E. M. VINEY, AND L. M. BLAXTER. 2002. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *Internacional Journal for Parasitology* **32**: 1507-1517.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783
- KUMAR, S. K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN AND M. NEI. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- GROVE, D. I. 1989. *Strongyloidiasis: A major roundworm infection in man*. Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 336p.
- HOFFMANN, R.P. 1987. Diagnóstico de parasitismo veterinário. Sulina, Porto Alegre, 33-39.
- LITTLE, M.D. 1966. Seven new species of *Strongyloides* (Nematoda) from Louisiana. *Journal of Parasitology* **52**: 85-97.
- PEREIRA, C. 1929. *Strongyloides ophidiae*. *Boletim Biológico de São Paulo* **15**: 16-17.
- REY, L. 2001. *Parasitologia*. 3.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 856p.

- RODRIGUES, O.H. 1968. Sobre nova espécie do gênero *Strongyloides* Grassi, 1879 (Nematoda, Rhabdiasoidea). Atas Sociedade de Biologia **12**:31-32.
- ROSSELLINI, M., K. R. SANTOS, T. H. BARELLA AND R. J SILVA. 2004. Ocorrência de *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae) em *Crotalus durissus terrificus* (Serpente, Viperidae) e *Philodryas olfersii* (Serpentes, Colubridae). **Anais...** VII Semana da Bio, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, Botucatu, São Paulo.
- SATO, H., K. SAUZUKI, A. OSANAI, H. KAMYIA, AND H. FURUOKA. 2006. Identification and characterization of the threadworm, *Strongyloides procyonis*, from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *The Journal of Parasitology* **92**: 63-68.
- SAITOU, N. AND M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- SINGH, S.N. 1954. Studies on The Morphology and Life-History of *Strongyloides mirzai* n.sp. from snakes in India. *Journal of Helminthology* **28**: 25-34.
- THOMPSON, J.D., T.J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN AND D.C. HIGGINS. 1997. CLUSTRAL X: windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- VIEIRA, F. M., S. S. LIMA AND E.C.A. BESSA. 2006. Morfologia e Biometria de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linneus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae) no município de Juiz de Fora, Minas gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **15**: 7-12.

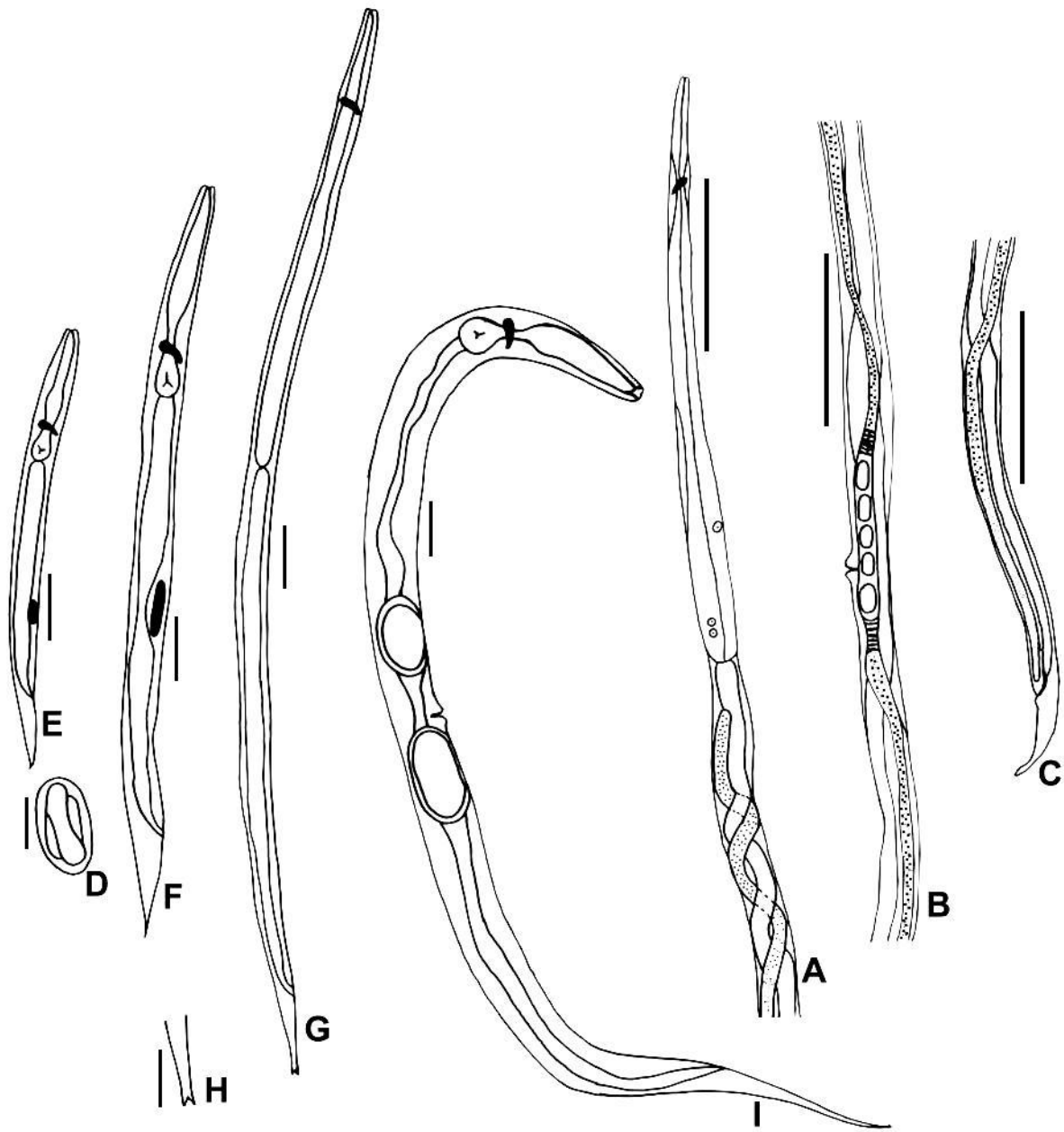


Figure 1. A-C) Parasitic female of *Strongyloides ophidiae*: A) detail of the anterior region – note the oesophagus and ovary spiraled around the intestine, B) detail of the vulva and eggs, C) detail of the tail – note the ovary partially spiraled around the intestine; D) egg; E-I) free-living forms – E) L1 rhabditoid larvae; F) L2 rhabditoid larvae; G) L3 filarioid larvae; H) detail of the tip and truncated tail of L3 filarioid larvae; I) free-living female. A,B,C – bar 200 μm ; D, E, F, G – bar 30 μm ; H– bar 10 μm .

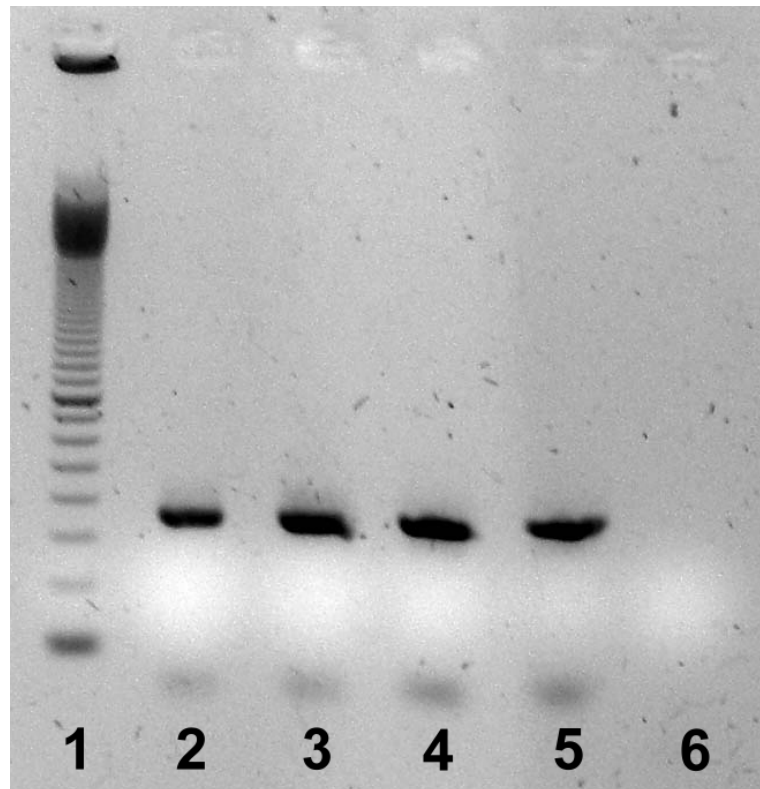


Figure 2. Agarose gel electrophoresis (2%) showing PCR amplification of the SSU rDNA gene with SSUA and SSU22R primer set (Dorris et al., 2002) using two DNA samples of each *Strongyloides venezuelensis* and *Strongyloides ophidia* species. Lane 1, 100 base-pair (bp) marker (GE Healthcare Bucs, UK). Lanes 2 and 3 – 350 bp amplification band from *S. venezuelensis* DNA samples. Lanes 4 and 5 – 350 bp amplification band from *S. ophidia* DNA samples. Lane 6. Reaction containing only reagents (without DNA).

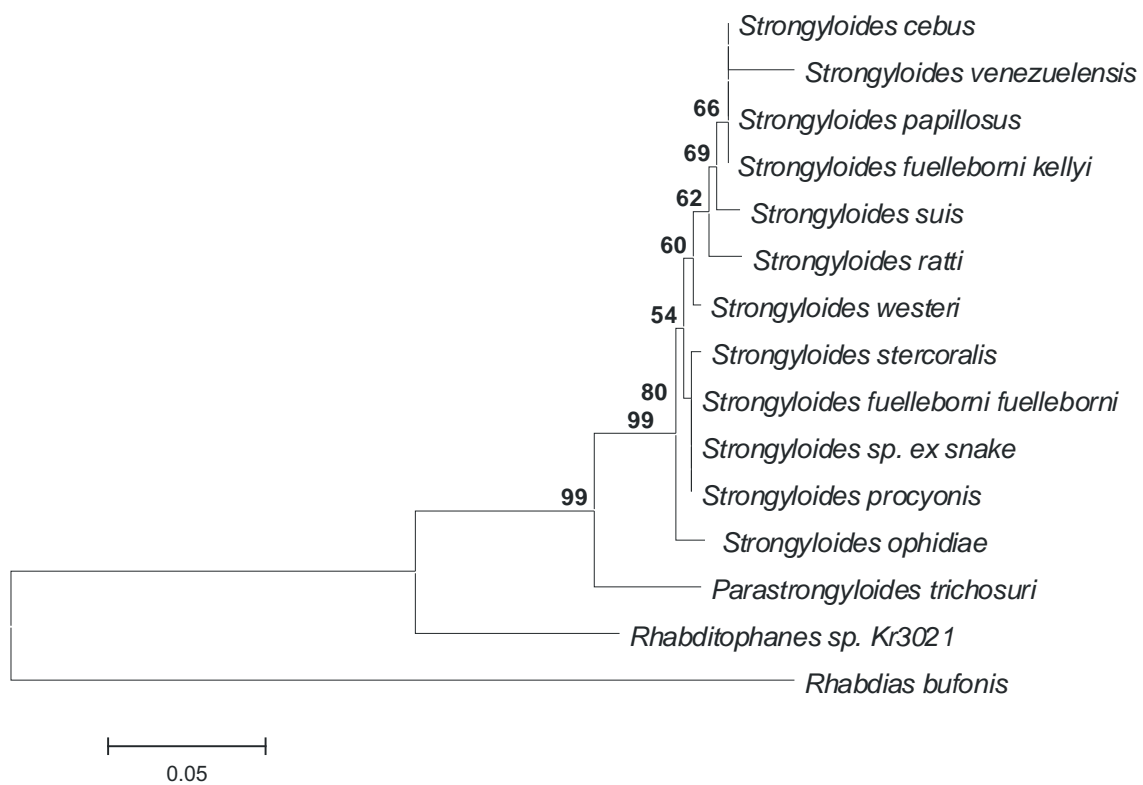


Figure 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on *Strongyloides* rDNA gene.