



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Cristiano Correa de Oliveira

**Estudo soroepidemiológico da infecção por paramixovírus
ofídico em serpentes mantidas em cativeiro**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Botucatu SP

2019

Cristiano Correa de Oliveira

Estudo soroepidemiológico do paramixovírus ofídico em
serpentes mantidas em cativeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Botucatu SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Cristiano Correa.

Estudo soroepidemiológico do paramixovírus ofídico em
serpentes mantidas em cativeiro / Cristiano Correa
Oliveira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: João Pessoa Araújo Junior

Capes: 20701004

1. Paramyxoviridae. 2. Répteis em cativeiro. 3. Ensaio
de imunoadsorção enzimática. 4. Cobra venenosa.

Palavras-chave: Cativeiro; ELISA; Ferlavírus reptiliano;
Paramixovírus ofídico; Serpentes.

Dedicatória

*Dedico este estudo ao Deus, criador do céu e da terra. Pois
Toda a boa dádiva e todo o dom perfeito vêm do alto,
descendo do Pai das luzes, em quem não há mudança nem
sombra de variação.*

*Por me dar a sabedoria que é primeiramente pura, depois
pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons
frutos, sem parcialidade, e sem hipocrisia.*

Minha rocha e meu refúgio, fortaleza minha.

AGRADECIMENTOS:

Meus pais, Estevão e Tereza, por serem meus maiores exemplos de trabalho, perseverança e honestidade. Pelo cuidado, apoio e sustento até aqui, por me ensinar que ser responsável pelas minhas atitudes é fundamental para meu desenvolvimento.

Minhas Filhas Beatriz e Bianca, que realizaram meu grande sonho de ser pai, e o fizeram de forma maravilhosa, pois são fontes de amor, carinho, auxílio, alegria e inspiração. Além de serem lindas e obedientes. Por vocês tenho vontade de vencer os obstáculos. Tenho muito orgulho de ser pai de vocês, Deus não poderia ter me presenteado com filhas mais extraordinárias.

Amo vocês com todo meu coração! (Eu amo mais...)

Minha Orientadora, Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos, certamente faltará palavras pra agradecer tudo que você fez por mim. Você abriu as portas para que este sonho se iniciasse, e me deu todo suporte durante todo o processo. Incentivando-me nos momentos difíceis. Inspirando-me com sua paixão pela ciência. Motivou-me com sua garra, determinação, com seu exemplo que transcende palavras, são atitudes de uma verdadeira cientista, provavelmente a maior que tive o prazer de conhecer. A você toda minha gratidão, pois foi o pilar central deste projeto.

Ao professor João Pessoa de Araújo Junior, que me coorientou de forma excepcional. Todo conhecimento transmitido, ora verbalmente, ora na bancada, pela paciência de ensinar quem pouco conhecia nesta área. Sem seus conhecimentos e apoio não seria possível a realização deste estudo.

Aos Aprimorandos do CEVAP: André Sartori, Letícia Murback, Letícia Dragone, Livia Cristina Ambrósio e Daniela Araújo, pelo suporte na coleta dos materiais biológicos. Em especial ao Leonardo Melo, que esteve comigo durante toda a coleta para o experimento, minha eterna gratidão.

Aos Pós-graduandos do CEVAP: Patrícia Lima, Claudia Vilalva, Laudicéia Oliveira, que passamos juntos por momentos difíceis e alegres, que fizeram a jornada mais intensa e feliz. Em especial a Claudia Vilalva Cassaro, que apesar de doutoranda se mostra uma cientista competente, excelente pesquisadora e amiga, que me além de me inspirar me ajudou muito na formatação deste projeto.

Ao grupo de Proteômica, por me acolherem, pela torcida, pela ajuda em assuntos simples e complexos do processo. Vocês foram imprescindíveis. Em especial, minha amiga Francilene Capel Carvalho, que me segurou pela mão no início da travessia, me mostrando os caminhos, muito obrigado Fran!

As secretárias do CEVAP, Letícia Araújo da Cunha, Luzia Martins, Renata Seabra Domingues, pelas direções, orientações, dicas imprescindíveis com toda documentação durante todo processo. Principalmente pela amizade e carinho que me fizeram continuar na jornada.

Ao professor Dr. Benedito Barraviera, que foi o idealizador deste projeto, pelo incentivo. Agradeço por confiar em mim para realizá-lo, e por todo o suporte financeiro, e estrutural que o senhor proporcionou para a realização deste estudo.

Ao professor Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, pelo suporte veterinário necessário para a realização do mesmo, e por ter sugerido que este fosse minha dissertação de mestrado.

A maravilhosa e extraordinária equipe do Laboratório IBTEC: Leila Sabrina Ullmann, Pâmela Merlo Marson, Jéssica Bindo, Cláudia Tosato, Fábio Sossai Possebon, Jaqueline Assunção Diniz, Camila Percário Rodirgues. Que me recebeu de braços abertos, me acolheu, me ensinou todas as técnicas analíticas e práticas laboratoriais, sempre cercado de muita alegria. Especialmente a Camila Dantas Malossi, que dividiu seu imenso conhecimento comigo, me incentivando em todos os momentos sempre com muita paciência, regado a alegria, e um bom cafezinho. Vocês são incríveis!

Aos amigos e irmãos em Cristo do grupo Peregrinos do amor, pelo apoio num momento difícil da vida. Em Especial ao Paulo Daniel Leite, que especialmente colaborou para meu ingresso neste projeto.

E a todos meus amigos, parentes e irmãos, que sempre torceram por meu sucesso. Seria impossível nominar, mas a vida me presenteou com muitas pessoas que verdadeiramente se alegram com minhas conquistas. Á vocês meu muito obrigado!!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS:

**Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
(CEVAP UNESP Botucatu SP)**

**Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por
Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu
(FMB UNESP Botucatu SP)**

**Ao Laboratório de Virologia do Instituto de Biociências de
Botucatu (IBB/UNESP Botucatu SP)**

**Ao Instituto de Biotecnologia
(IBTEC/UNESP Botucatu SP)**

**Ao Instituto Vital Brasil
(IVB Niterói-RJ)**

**Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres.
(CETAS IBAMA -Juiz de Fora MG)**

Não sabeis vós que os que correm no estádio, todos, na verdade, correm, mas um só é que recebe o prêmio? Correi de tal maneira que o alcanceis. E todo aquele que luta, exerce domínio próprio em todas as coisas; ora, eles o fazem para alcançar uma coroa corruptível, nós, porém, uma incorruptível. Pois eu assim corro não como indeciso; assim combato, não como batendo no ar.

RESUMO

O veneno de serpente tem sido utilizado para diversas finalidades terapêuticas; portanto, desde o início do século XX, a criação de serpentes em cativeiro tornou-se uma atividade cada vez mais relevante. Os principais motivos da existência e permanência destes cativeiros se atribuem à produção dos soros antiofídicos, e o uso de seus venenos e seus componentes isolados com potenciais aplicações à saúde animal e humana. Porém, a vida em cativeiro pode resultar na síndrome da má adaptação, a qual o animal sob estresse desenvolve inapetência e, conseqüentemente há o acometimento da imunidade, podendo desenvolver infecções por micro-organismos como fungos, bactérias e vírus. Desta forma, o controle e prevenção de infecções em serpentes mantidas em cativeiro tornaram-se assuntos muito importantes. Dentre as doenças infecciosas virais, têm-se a infecção pelo *Paramixovírus* ofídico, atualmente, denominado *Ferlavírus reptiliano*. Este vírus é altamente devastador em serpentes, pois atua no sistema nervoso central e respiratório, podendo levar à morte e/ou morbidade na fase aguda da doença, sendo que na fase crônica, o animal pode atuar como reservatório do vírus, e disseminar a doença no plantel. Atualmente, não há tratamento específico nem vacinas disponíveis para esta virose. Porém, testes sorológicos estão emergindo para a detecção de anticorpos. Dentre estes testes, encontram-se o ensaio de Inibição de Hemaglutinação (HI) e o ensaio de ELISA de Bloqueio de Fase Líquida (BFL-ELISA), os quais diferem na sensibilidade e especificidade analítica. Diante do desafio de diagnosticar e prevenir esta grave infecção, o objetivo deste projeto foi realizar um estudo soropidemiológico da infecção por paramixovírus ofídico em serpentes mantidas em cativeiro através de testes de HI e BFL-ELISA. Para os testes, utilizou os soros de 302 serpentes das famílias *Viperidae*, *Boidae* e *Colubridae*, as quais eram provenientes de cativeiros intensivos e semiextensivos de três estados da região sudeste do Brasil. Os resultados evidenciaram que os animais, independente da espécie e do tipo de cativeiro, possuem anticorpos anti-paramixovírus, inclusive àqueles recém-chegados da natureza. As serpentes da espécie *Crotalus durissus terríficus*, (*C.d.t.*) possuem maior quantidade de anticorpos que as demais espécies estudadas, independente da origem e do tipo de alojamento. Dentre os animais da espécie *C.d.t.*, houve um aumento significativo de anticorpos naquelas que vivem no serpentário semiextensivo em comparação com as que vivem no serpentário intensivo. É provável que o *Paramixovírus* seja um vírus oportunista e endêmico na natureza da região Sudeste do Brasil, sendo favorecido pelo contato das serpentes de vida livre. Novos estudos para detecção do vírus nas serpentes devem ser realizados, uma vez que, tanto os animais de cativeiro como de vida livre apresentam anticorpos contra o paramixovírus ofídico.

Palavras-chave: *Paramixovírus ofídico*, *Ferlavírus reptiliano*, estudo soropidemiológico, serpentes, cativeiro, Inibição de Hemaglutinação, BFL-ELISA.

ABSTRACT

Snake venom has been used for several therapeutic purposes. Therefore, breeding snakes in captivity has become an increasingly relevant activity since early 20th century. The main reasons for the existence and permanence of these captivities are the production of snake antivenom and the use of venom and its isolate compounds with potential applications in human and animal health. However, living in captivity may result in the maladaptation syndrome, in which the animal under stress develops inappetence and, consequently, a decrease in immunity, becoming more likely to develop infections caused by microorganisms as fungi, bacteria and viruses. Thus, the control and prevention of infections in snakes kept in captivity became very important subjects. The infection by the ophidian paramyxovirus named *reptilian ferlavirus* is among the viral infectious diseases. This virus is highly devastating in snakes because its action in central and respiratory nervous system and may lead to death and/or morbidity in the acute stage of the disease, considering that the animal may act as a reservoir of the virus in the chronic stage and spread the disease in the breeding stock. Nowadays, there isn't a specific treatment or vaccines available for strike this viral infection, however, serological tests are emerging for antibodies detection. Hemagglutination Inhibition (HI) and Liquid Phase Blocking ELISA (LPB-ELISA) are among these tests, which differs from each other in sensitivity and analytical specificity. Facing the challenge of diagnosing and avoiding this severe infection, the aim of this project was to carry out a seroepidemiological study of the ophidian paramyxovirus in snakes kept in captivity through of HI and LPB-ELISA tests. Serums from 287 *Viperidae*, *Boidae* and *Colubridae* snakes families were used for the tests, which came from intensive and semi-extensive captivities from three states of the Southeastern region of Brazil. The results showed that the animals have anti-paramyxovirus antibodies, regardless of the species and type of captivity, including those ones who have just arrived from nature. Snakes from the *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) species have a higher amount of antibodies than other species studied, regardless of origin and type of lodging. Considering C.d.t. animals, there was a significant increase of antibodies in the snakes living in the semi-extensive serpentarium, in comparison to the ones living in the intensive serpentarium. The paramyxovirus is probably an opportunist and endemic virus in nature at the Southeastern region of Brazil, being favored by the contact with wild snakes. New studies for the detection of the virus in snakes must be performed, considering that both captivity and free animals present antibodies against the ophidian paramyxovirus.

Keywords: Ophidian paramyxovirus, reptilian ferlavirus, seroepidemiological study, snakes, captivity, Hemagglutination Inhibition, LPB-ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Coleta de sangue total das serpentes.	35
Figura 2. Mapa da região sudeste do Brasil, demonstrando o local de origem das serpentes.....	36
Figura 3. A) Garrafas e Rollers para cultivo celular. B) Células Vero.....	37
Figura 4. A) Garrafas e Rollers contendo paramixovírus. B) Células Vero infectadas pelo <i>Paramixovírus</i>	38
Figura 5. Coleta de sangue de galinha para Hemaglutinação.	39
Figura 6. Ensaio ELISA do tipo Bloqueio em Fase Líquida (BFL ELISA)	40
Figura 7. Reagentes para o BFL ELISA.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras, média e erro padrão da presença de anticorpos anti-OPMV pelo teste BFL ELISA das diferentes espécies em diferentes tipos de cativeiro.	49
Tabela 2. Parâmetros quantitativos da porcentagem de inibição pelo ensaio BFL ELISA e comparação entre as espécies de serpentes e seus diferentes tipos de cativeiro e manejo (coletivo e ou individual)	52
Tabela 3. Medidas de resumo numérico da quantidade de anticorpos pelo ensaio BFL ELISA, em cascavéis submetidas em ambientes diferentes: Quarentena 1, Quarentena 2 e Baia Coletiva.	53
Tabela 4: Relação das serpentes <i>C.d.t</i> submetidas aos três diferentes ambientes do CEVAP: Quarentena1, Quarentena2, Baia Coletiva.	53
Tabela 5. Número de amostras(n), média e erro padrão da quantidade de anticorpos anti-OPMV pelo teste de Inibição de Hemaglutinação.	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Média e erro padrão, da quantidade de anticorpos anti-OPMV pelo Teste BFL ELISA, em diferentes espécies de serpentes, submetidas a diferentes tipos de cativeiro.	50
Gráfico 2. Distribuição da quantidade de anticorpos para os mesmos animais submetidos a três ambientes diferentes.	54
Gráfico 3. Média e erro padrão do teste de Inibição de Hemaglutinação.	56

Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Serpentes em Cativeiro	21
2.2 Doenças Infecciosas em serpentes de cativeiros.....	23
2.3 Doenças Infecciosas no Trato Respiratório de Serpentes.....	24
2.4 Infecções por <i>Paramixovirus ofídico</i>	24
2.5 Testes Diagnósticos	29
2.6 Imunidade dos répteis	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Materiais biológicos e Autorização ética.....	34
4.2 Cultivo de células vero	36
4.3 Cultivo do paramixovírus ofídico (OPMV).....	37
4.4 Prova sorológica de Hemaglutinação para titulação do antígeno paramixovírus	38
4.5 Ensaio de ELISA do tipo Bloqueio em Fase Líquida (BFL ELISA)	39
4.5.1 Padronização dos reagentes para o BFL ELISA	40
4.5.2 Determinação de diluição ótima dos antissoros de captura e detector	41
4.5.3 Determinação da diluição ótima do antígeno	41
4.5.4 Método de bloqueio em fase líquida (BFL ELISA) para detecção de anticorpos contra OPMV em soros de serpentes.....	42
4.5.4.1 Microplacas	42
4.5.4.2 Adsorção do anticorpo de captura.....	42
4.5.4.3 Reação do soro teste versus OPMV em fase líquida	42
4.5.4.4 Etapas de lavagens	43
4.5.4.5 Bloqueio de ruídos da reação imunoenzimática	43
4.5.4.6 Titulação do OPMV residual após reação da fase líquida.....	43
4.5.4.7 Leitura e interpretação dos dados	44

4.5.4.8 Determinação da porcentagem de inibição de cada diluição	44
4.6 Prova sorológica de Inibição de Hemaglutinação (HI) para detecção de anticorpos contra OPMV	44
4.7 Análises estatísticas.....	46
4.8 Tipos de cativeiros do CEVAP.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Quantificação de anticorpos por meio do ensaio de BFL ELISA	48
5.2 Quantificação de anticorpos por meio de Teste de Inibição de Hemaglutinação	55
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERENCIAS.....	69
9. ANEXO I APÊNDICE I – Aprovação do Comitê de ética.....	76

1. INTRODUÇÃO

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) é uma Unidade Complementar da Universidade Estadual Paulista (UNESP), localizada no Campus de Botucatu, Estado de São Paulo (SP), a qual é credenciada como criadouro científico junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Neste Centro, serpentes são mantidas em cativeiro através de regime intensivo e semiextensivo de criação.

Devido à importância terapêutica dos venenos de serpentes, estes animais são mantidos em cativeiros, a fim de melhor compreenderem seus venenos e seus potenciais bioativos e, conseqüentemente, favorecer a obtenção de matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos, como por exemplo, o novo selante heterólogo de fibrina, o qual está sendo testado no tratamento de úlceras crônicas (1).

No entanto, é um desafio manter serpentes em cativeiros, onde revisões sobre manutenção de serpentes em cativeiro sugerem que a combinação de variáveis como temperatura, umidade, luz, alimentação, espaço físico e saneamento é necessária para a criação adequada (2,3). Porém, mesmo com todos esses cuidados, a adaptação ao cativeiro não é garantida e muitos indivíduos morrem dentro de dois anos de aquisição (4) por não se adaptarem as condições de confinamento.

Com a imunidade diminuída pela má adaptação, que conseqüentemente, pode provocar emagrecimento e ulcerações da cloaca, na pele e na mucosa intestinal, os animais em cativeiros tornam-se suscetíveis às infecções por microrganismos patogênicos e por aqueles normalmente inócuos.

Dentre as infecções mais comuns em serpentes de cativeiros, estão às infecções respiratórias segundo Jacobson (5), são responsáveis por considerada morbidade e mortalidade. Nas últimas décadas foi descoberto um vírus que atinge o sistema respiratório de forma devastadora de serpentes em cativeiros, um paramixovírus ofídico, (6-8) denominado posteriormente por Fer de Lance Vírus, e atualmente *Reptilian Ferlavirus* (9). Este vírus se transmite por spray e contado com mucos sendo assim o cativeiro um local facilitador da transmissão. Como ocorreram de fato surtos da infecção por *Paramixovírus* no CEVAP nos anos de 2001, 2015 e 2016 em cascavéis da espécie *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) alojadas no serpentário semiextensivo, estes episódios devastaram o plantel causando a morte direta de algumas serpentes e, indiretamente pois outras serpentes dessas baias após o surto, foram sacrificadas como medida de segurança.

Como estes animais não apresentam sinais patognomônicos para o diagnóstico específico (10) , dificulta-se o combate e o controle de novos surtos.

A espécie *Crotalus Durissus Terrificus* (C.d.t) é a mais afetada por este vírus segundo Jacobson e colaboradores (11). Esforços têm sido feito para a realização de exames diagnósticos deste agente viral, como PCR utilizado para diagnosticar os surtos do CEVAP realizado pelo laboratório de virologia do IBTEC UNESP Botucatu. Para diagnóstico de anticorpos contra o vírus, têm-se o teste de Inibição de Hemaglutinação (HI), embora sua sensibilidade analítica seja limitada. O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) tem se destacado na prática de estudo com este vírus ofídico e, embora seja relativamente simples, possui atributos como alta sensibilidade e especificidade analíticas. No seu formato indireto, o ELISA de bloqueio em fase líquida requer uma molécula de anti-IgY específica, a qual reconhece e se liga aos anticorpos presentes no soro que estão sendo testados.

Este estudo foi realizado no CEVAP que possuía quatro ambientes no momento do desenvolvimento deste trabalho para manter as serpentes em cativeiro, os quais são chamados de: Quarentena, Museu ou Serpentário Vivo, Cativeiro semiextensivo e Cativeiro intensivo.

O selante heterólogo de fibrina tem sido pesquisado há mais de 20 anos pelo CEVAP, e é constituído de uma serinoprotease, também conhecida como giroxina, extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e de um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos (*Bubalus bubalis*). As pesquisas pré-clínicas realizadas permitiram a ANVISA autorizar um ensaio clínico fase I/II. Até 2017 foram recrutados 30 pacientes, cujo relatório final para avaliação da segurança do produto foi entregue à ANVISA em 2018. A partir da aprovação do relatório fase I/II será possível requerer a realização do ensaio de eficácia clínica (fase III) onde será multicêntrico e constituído de centenas de pacientes. Em 2018 também foi aprovado pelo Ministério da Saúde, a fábrica de amostras de medicamentos Biológicos para Pesquisa Clínica no CEVAP que terá por missão produzir amostras, incluindo-se o selante heterólogo de fibrina, dentro das boas práticas laboratoriais exigidas pela ANVISA. Portanto, para que se viabilize esta proposta de ensaio clínico fase III há a necessidade do manejo cuidadoso, sob protocolos validados dos bubalinos e das serpentes mantidas em cativeiro. Estas últimas, quando mantidas em cativeiro podem ser acometidas por infecções fatais, entre elas a infecção pelo *Paramixovirus*. Este vírus é encontrado em diferentes répteis, mas as cascavéis são mais sensíveis e susceptíveis a surtos. Estes, quando ocorrem acometem o plantel causando óbito dos animais principalmente por insuficiência respiratória. A incidência de novos surtos de *Paramixovírus* pode comprometer a fabricação do selante, que é um produto biológico natural e conseqüentemente, causar prejuízos

financeiros incalculáveis para a ciência acadêmica, para o centro de pesquisa, e principalmente para os pacientes que seriam atendidos para o tratamento de úlceras venosas crônicas. Portanto o desenvolvimento de um estudo soroepidemiológico da infecção por *Paramixovirus ofídico* é de fundamental importância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Serpentes em Cativeiro

As toxinas extraídas dos venenos das serpentes são uma fonte importante de moléculas bioativas seletivas e eficientes com elevado potencial farmacológico. Venenos são ricos em proteínas e toxinas peptídicas, e têm especificidade para uma ampla gama de receptores teciduais, tornando-os clinicamente desafiadora, especialmente para o desenvolvimento de drogas. (12,13). Devido a sua importância a criação de serpentes em cativeiro tem se tornado uma importante ferramenta para estudo desses venenos e toxinas.

No entanto o manejo de serpentes é desafiador, pois a eficácia da criação é diretamente ligada a sobrevivência dos animais. (14). Leloup, (15) sugere três sistemas para manutenção de serpentes em larga escala para a produção de veneno: cativeiro intensivo, semiextensivo e extensivo. Melgarejo (16) relata que o cativeiro semiextensivo onde se alojam grupos em condições similares as existentes na vida livre são vantajosos. Embora todos tenham vantagens e desvantagens, o cativeiro intensivo é amplamente adotado em serpentes reprodutoras para a produção de veneno (15-17). Este sistema simplifica a manutenção, permitindo inspeções constantes e fáceis, controle individual de alimentação e saúde, controle de temperatura de acordo com requisitos específicos e instalações menores (15).

Uma série de revisões sobre manutenção de serpentes em cativeiro sugere que a combinação de variáveis como temperatura, umidade, luz, alimentação, espaço físico e saneamento são necessárias para a criação adequada (2,3). No entanto, mesmo com todo esse cuidado, a adaptação ao cativeiro não é garantida e muitos indivíduos morrem dentro de dois anos de aquisição. Braz (18) sugere que os primeiros três meses em cativeiro são os mais críticos em termos de sobrevivência e

adaptação. Assim, qualquer tentativa de entender os fatores que podem afetar a sobrevivência em cativeiro é fundamental para a implementação bem sucedida de um plantel de serpentes para a produção de veneno (4).

A principal causa de morte em répteis de cativeiro é sua incapacidade de se adaptar ao ambiente cativo; isso é chamado de síndrome de má adaptação (4). Essa síndrome foi responsável por cerca de 80% das mortes de serpentes em cativeiro no Jardim Zoológico da Filadélfia e, pode ser definida como os efeitos patológicos do estresse em um animal associado a um ambiente cativo (4,19). A síndrome de má adaptação pode causar anorexia, emagrecimento (mesmo que os animais estejam se alimentando), fragilidade tecidual, aumento da suscetibilidade à infecção (mesmo com organismos normalmente inócuos), crescimento excessivo de parasitas, ulceração intestinal, crescimento reduzido e falha reprodutiva (4,19). O resultado final é que todas as reservas de gordura estão esgotadas.

Em geral, os répteis são suscetíveis à uma ampla gama de agentes infecciosos. Em muitos casos, esses agentes também infectam populações em cativeiro quando em contato com animais de vida livre. A falta de protocolos de quarentena e de testes que possam fazer uma seleção dos animais doentes contribui para a disseminação de agentes infecciosos nas coleções de cativeiro (20).

Em contrapartida, agentes infecciosos podem ser introduzidos na população de vida livre através de reintrodução ou escape de animais do cativeiro. Animais de vida livre, sendo virgens para muitos desses agentes, podem desenvolver doença rapidamente, frequentemente resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (21).

Em répteis, muitos agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, fungos e parasitas têm sido associados a altas taxas de morbidade e mortalidade em

populações de cativeiro (22). Frequentemente, infecções virais são subdiagnosticadas devido à presença de infecções bacterianas secundárias, colheita inadequada de amostras ou a falta de testes diagnósticos específicos para determinar a exposição ou infecção a um determinado vírus (22). Especificamente em serpentes, as infecções do trato respiratório assumem posição de destaque, sendo causadas por agentes de diferentes naturezas, muitas vezes pela disseminação de processos infecciosos localizados e podendo levar à condição de sepse do indivíduo. Nas últimas duas décadas, foi reconhecido um agente viral de ação devastadora sobre os plantéis de serpentes, o qual foi identificado como sendo um membro da família *Paramyxoviridae* e tornou-se conhecido como *Ophidian Paramyxovirus* (OPMV) (6-8). Atualmente ele é classificado como ferlavírus reptiliano (9).

2.2 Doenças infecciosas em serpentes de cativeiro

Para doenças infecciosas em serpentes, Cowan (4) concluiu que a principal causa de mortalidade de serpentes no *Philadelphia Zoological Garden* é a síndrome da má adaptação que deixam os animais imunodeprimido e suscetíveis às infecções. Esta opinião é corroborada por Belluomini e colaboradores (23), após realizarem exames necroscópicos em 907 serpentes dos gêneros *Crotalus* (n = 455) e *Bothrops* (n = 452) que foram ao óbito no Instituto Butantan entre 1969 e 1970. Também concordam com esta afirmação Leinz e colaboradores (17), em seu trabalho sobre sobrevivência de *B. jararacussu* em cativeiro.

As doenças infecciosas, segundo Marcus e colaboradores (22), seriam a maior causa imediata de morte de répteis em cativeiro. Um estudo retrospectivo conduzido no zoológico de *Detroit* (24) concluiu que, dos 1300 óbitos de répteis ocorridos entre

1973 e 1983, 36,6% tinham sido causados por agentes microbianos, a maior porcentagem de morte até aquele momento. Este mesmo estudo revelou que as serpentes do gênero *Crotalus* ocupavam o terceiro lugar entre as espécies mais afetadas e que, das 1300 mortes, 40% haviam ocorrido por doenças do trato respiratório.

2.3 Doenças infecciosas no trato respiratório em serpentes

Dentre as doenças infecciosas do trato respiratório, Jacobson (5) afirma que as doenças do sistema respiratório são comuns em répteis e são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade em zoológicos e coleções particulares. Frye(25) justifica que o sistema respiratório relativamente simples dos répteis e a falta de um diafragma funcional, os tornam particularmente sensíveis às infecções respiratórias severas. Suas características pulmonares morfológicas e fisiológicas tendem a favorecer a retenção de secreções respiratórias e exsudatos nos tecidos do trato respiratório inferior. Em serpentes, são descritas doenças respiratórias causadas por parasitas, fungos e, principalmente, por bacilos Gram-negativos (26).

2.4 A infecção por paramixovírus ofídico

Recentemente foi reconhecido um agente viral de ação devastadora em serpentes cativas, primeiramente identificado como da família *Paramyxoviridae*, conhecido como paramixovírus ofídico, atualmente denominado ferlavírus reptiliano. (7-9).

Burke (27) afirmava que, até então, nada se sabia sobre o papel dos vírus como agentes etiológicos primários de doença em répteis. Em 1976, embora se suspeitasse que a causa da infecção fatal fosse a bactéria *Pseudomonas* em um

serpentário de *Bothrops atrox* na Suíça com 30% de óbito do plantel, isolou-se um tipo de vírus em suspensões de pulmões das serpentes afetadas (6). Posteriormente, Clark e colaboradores (28) denominaram esse vírus de *Fer de Lance vírus* (FDLV) e o identificaram como um provável *myxovirus* (ortho; para ou meta).

No ano seguinte, Jacobson e colaboradores (8) descreveram o caso de uma serpente *Crotalus lepidus* com história de doença progressiva do sistema nervoso central que havia sido submetida à necropsia. Os achados histopatológicos evidenciavam pneumonia intersticial, alterações de órgãos do sistema nervoso e, à microscopia eletrônica, constataram-se inúmeras partículas virais no espaço extracelular do tecido do tronco cerebral. Finalmente, um vírus similar ao *Paramyxovirus* foi isolado a partir de tecido pulmonar, em cultura de células cardíacas de serpentes, e este por sua vez, foi observado por microscopia eletrônica, sendo semelhante em tamanho e formato àquelas partículas vistas no tecido nervoso. Os efeitos citopáticos, a sensibilidade ao éter, a capacidade hemaglutinante e a aparência ultraestrutural, reforçariam a suposição de que o agente era um membro da família *Paramyxoviridae*. Clark e colaboradores (28) afirmaram que o FDLV era um *Paramyxovirus* por possuir um genoma com RNA de cadeia simples com um valor de sedimentação de 50S. Atualmente, a taxonomia do paramixovirus atualizada em agosto de 2018 é Philo: *Negarnaviricota*, Sub Philo: *Haploviricotina*, Classe: *Monjiviricetes*, Ordem: *Mononegavirales*, Família: *Paramyxoviridae*, Gênero: *Ferlavirus*, Espécie: *Reptilian Ferlavirus* (9).

Jacobson e colaboradores (11) relataram que, nos meses de fevereiro e março de 1980, o Zoológico de Louisiana, EUA, perdeu 35 serpentes de sua coleção de 438 animais. Os óbitos ocorreram somente entre as serpentes da família *Viperidae*,

tendo sido o gênero *Crotalus* um dos mais atingidos. Vírus com as características de *Paramyxovirus* foram isolados de tecidos dos animais atingidos e realizaram-se provas sorológicas de inibição da hemaglutinação em 22 serpentes que sobreviveram. Dos resultados, os títulos do vírus positivos variaram de 20 a 2560, com apenas dois animais negativos (11).

Nos anos subsequentes, vírus relacionados aos paramixovírus foram isolados de outras espécies de serpentes. Ahne et al. (29) obtiveram o isolamento de um tipo de vírus semelhante a um *Myxovirus* a partir de órgãos da serpente *Elaphe oxycephala*, sendo que Potgieter e colaboradores (30) descreveram uma doença respiratória fatal em *Vipera xanthina* associada com a infecção por um paramixovírus relacionado ao vírus *Parainfluenza*. Ahne e colaboradores (31) relataram o isolamento de partículas semelhantes ao *Parvovirus* a partir de órgãos de uma serpente *Elaphe guttata* com sinais de pneumonia.

Jacobson e colaboradores (32), tentando encontrar uma vacina que protegesse as serpentes contra a doença causada pelo OPMV dos ofídios, inativaram uma estirpe isolada de uma *Dendroaspis polylepis* e utilizaram-na para preparar vacinas com e sem adjuvantes. Um conjunto de serpentes da espécie *Crotalus atrox* foram então vacinadas e, embora diversas serpentes tenham desenvolvido títulos, a resposta entre os indivíduos foi considerada variável e transitória. Jacobson (33) afirmou que certas espécies de serpentes do gênero *Crotalus* são particularmente suscetíveis à infecção pelo OPMV. Em epizootias causadas por este vírus, estando presentes *C. durissus* e *C. basiliscus*, em muitas situações, estas seriam as primeiras espécies a morrer.

Blahak (34) efetuou a caracterização de estirpes de vírus isolados de serpentes que vieram a óbito em um zoológico da Alemanha, e, Richter e colaboradores (35)

efetuaram a caracterização de estirpes isoladas nos Estados Unidos. Ambos concluíram que estes vírus possuíam características de paramixovírus. Quanto à relação com paramixovírus aviários ou de mamíferos, o primeiro observou reações cruzadas em testes sorológicos com paramixovírus aviário tipo 1 e 7, concluindo, porém, através de ensaios de eletroforese, que suas proteínas HN, NP e M apresentavam diferentes massas moleculares. Richter e colaboradores (35) não observaram reações cruzadas dos paramixovírus isolados de serpentes com os de outras espécies.

Cranfield e colaboradores (36), descrevendo "paramixovirose dos ofídios", afirmam não haver sinais patognomônicos para o diagnóstico desta infecção. Os sinais clínicos da doença são variáveis, o que dificulta o diagnóstico. Os mais frequentes são: presença de secreção hemorrágica nas narinas e traqueia, dificuldade e estridor respiratório por isso respiram com a boca aberta, opistótono, paralisia flácida, tremores de cabeça, alterações de propriocepção, postura corporal anormal, anorexia/regurgitação, diarreia mucoide com odor fétido, letargia e até morte súbita. (37,38,39,40). A doença apresenta-se com uma grande variação de sinais, os quais tornam difícil o diagnóstico para o clínico. Suas apresentações clínicas poderiam ser divididas em duas categorias: a) aguda, quando os animais exibem sinais respiratórios e/ou neurológicos por curto período antes de virem a óbito ou, frequentemente, são apenas encontrados mortos; b) crônica, quando se observam sinais inespecíficos de doença ao longo de meses, emagrecimento e pneumonias por infecção bacteriana secundária, sendo estes animais portadores do vírus, que disseminam o agente, mas não demonstram sinais de doença.

Até então, haviam incertezas que implicariam definitivamente o OPMV como agente de doença em serpentes. Jacobson e colaboradores (37). Após inoculação experimental intratraqueal em uma espécie de serpente o gênero *Crotalus* com uma estirpe de OPMV, puderam acompanhar o desenvolvimento das lesões compatíveis através de exames histológicos, obtendo o reisolamento do agente a partir dos animais inoculados (37).

Esforços têm sido direcionados na caracterização molecular das estirpes de OPMV anteriormente isoladas. Ahne e colaboradores (41) desenharam *primers* para obtenção, pela técnica de PCR, de sequências de fragmentos dos genes L e HN de 16 estirpes de OPMV isoladas nos países Estados Unidos, Alemanha e Suíça, as quais foram objetos de estudos filogenéticos. Franke e colaboradores (42), a partir de sequências de fragmentos dos genes L e F, também realizaram análises filogenéticas em 18 estirpes virais de paramixovírus isoladas de serpentes, propondo um novo gênero na família *Paramyxoviridae* para os *Paramyxovirus* de répteis.

No Brasil, a enfermidade causada pelo OPMV foi relatada em serpentes *Bothrops alternatus* e *C. d. terrificus*. Kolesnikovas e colaboradores (43) descreveram um surto ocorrido em *B. alternatus* jovens mantidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, o qual foi investigado utilizando-se exames histopatológicos, imunoistoquímicos e microbiológicos. Nogueira e colaboradores (39) obtiveram o isolamento do OPMV a partir da secreção pulmonar de um exemplar de *C. d. t.* em cativeiro mostrando sinais de pneumonia, tendo a identificação do vírus sido confirmada pela realização de *nested* PCR das culturas celulares positivas. Esse mesmo grupo de pesquisadores descreveu um surto em cascavéis em um criadouro científico na cidade de Botucatu, SP. Nesse relato, foram estudados 24 animais, dos quais 17 apresentaram títulos de anticorpos acima de 10 nos ensaios de inibição da

hemaglutinação. A partir de 11 desses animais, isolou-se o vírus em cultura de células VERO, os quais posteriormente, foram identificados por *nested*-PCR.

O OPMV é transmitido por aerossóis e pelo contato direto com secreções respiratórias, ectoparasitas (como os carrapatos) e as excretas digestivas. (39). Não há tratamento específico nem vacinas disponíveis para esta virose. Os antibióticos de amplo espectro têm sido empregados para aumentar a sobrevivência dos animais controlando infecções secundárias causadas por bactérias ou protozoários (44,38).

Por suas características é oportuno para que se aprofundem as reflexões sobre o paramixovírus que infectam os répteis. (45).

2.5 Testes diagnósticos

Testes sorológicos estão emergindo como poderosas ferramentas tanto para diagnóstico como para vigilância sanitária em répteis para verificar infecção e/ou exposição prévia a certos patógenos. Testes têm sido desenvolvidos para paramixovírus em serpentes.

A inibição da hemaglutinação (HI) é o tipo mais comum de ensaio realizado antes da morte para avaliação do Status da doença causada pelo OPMV. HI pode ser usado para determinar um contato prévio da serpente com o vírus. (46)

Dos vários testes sorológicos, o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) é o teste com maior aplicabilidade em répteis. (47). Embora o ensaio de ELISA seja relativamente simples, ele possui atributos como alta sensibilidade e especificidade analíticas. No seu formato indireto, requer uma molécula de anti-IgY específica que reconhece e se liga ao anticorpo que está sendo testado. Já a técnica de ELISA de bloqueio em fase líquida (BFL ELISA), atua como um método para quantificação de anticorpos de várias espécies diferentes não necessitando de conjugados

específicos para as mesmas (48). Este fator é fundamental no caso de pesquisa de anticorpos em diferentes espécies de ofídios e até mesmo outros répteis, uma vez que, o OPMV já foi detectado em outros animais como lagartixas, que podem apresentar diferenças antigênicas em suas moléculas de anticorpos. Entretanto, por utilizarem conjugados anti-imunoglobulina de jiboia (*Boa constrictor*), a reação só apresentou boa reatividade para membros da família *Boidae*, os quais são mais resistentes à infecção pelo OPMV que os membros da família *Viperidae* (11).

Ensaio de ELISA indireto não são adequados como constataram Kania et al. (49), os quais padronizaram um ensaio de ELISA indireto para a quantificação de anticorpos contra o OPMV. Uma outra vantagem do BFL-ELISA sobre o ELISA indireto é a não necessidade de ter o vírus purificado para servir como antígeno podendo ser utilizado uma suspensão de células infectadas, a qual apresentou ótima estabilidade quando armazenado a temperatura de 4° C(48).

Para o OPMV atualmente a única técnica disponível para a detecção e quantificação de anticorpos é a de inibição da Hemaglutinação (HI). Entretanto, a mesma apresenta um limiar de detecção elevado, o que propicia obtenção de resultados falso-negativos. Os inquéritos sorológicos apresentam baixo custo e permitem o exame de um grande número de animais. A vigilância da presença da infecção causada por OPMV em um plantel de ofídeos, utilizando o monitoramento sorológico, permite a realização de programas de controle e prevenção dessa importante enfermidade (50).

No presente estudo, realizou-se um inquérito sorológico com o emprego da técnica de HI e BFL ELISA para avaliar a ocorrência de paramixovirose ofídica nos diversos setores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP, campus de Botucatu, SP.

2.6 Imunidade dos répteis

Répteis se protegem contra infecções por barreiras físicas, resposta mediada por células e por imunidade humoral. Répteis possuem um sistema linfóide funcional (medula óssea, timo, baço e tecido linfóide intestinal) bem como todo um repertório de leucócitos que induzem imunidade específica. O número e proporção relativa dos diferentes leucócitos já reportados até hoje variam muito (51). O sistema imune dos répteis é dependente da presença de três sistemas receptores: o TCR (“thymus cellreceptor”), o BCR (“Bursa Cell Receptor”), e o MHC (“Major HistocompatibilityComplex”). Uma ampla variedade de fenômenos imunes cito-mediados está presente em várias espécies de répteis. Elas incluem rejeição a enxertoalogênico ou xenogênico, fagocitose, reação de cultura mista de linfócitos, e de enxerto contra o hospedeiro. Evidência da existência de interleucina-2 (IL-2) and fator de necrose tumoral (TNF) vem de pesquisas realizadas com lagartixa.

Répteis respondem melhor a antígenos particulados do que para antígenos solúveis. A rejeição de enxerto e o número na contagem diferencial de células sanguíneas são dependentes da temperatura corporal. O anticorpo produzido na resposta imune primária é o IgM e na resposta secundária o IgY. Toda resposta humoral em répteis é dependente de células T. Comparações antigênicas sugerem que a IgY dos répteis é semelhante à IgA dos mamíferos. Imunoglobulinas IgY podem ser passivamente transportados

da mãe para a prole via ovo ou diretamente, no caso dos répteis vivíparos como as cascavéis, e não encontraram-se trabalhos sobre a cinética dessas no recém-nascido, que é imunologicamente competente. Nem IgG ou IgE são encontrados nos répteis. Anticorpos do isotipo IgY exibem características funcionais tanto de IgG

como de IgE. A IgY apresenta quatro domínios constantes e estudos de comparação de sequências entre IgY e IgG dos mamíferos tem demonstrado que provavelmente o segundo domínio da IgY foi deletado durante a evolução dos mamíferos (52). Conforme descrito por Schumacher (21), o conhecimento da patofisiologia das doenças de répteis está aumentando e com a disponibilidade de novos agentes terapêuticos e avanços nas técnicas de diagnóstico, o tratamento e prevenção das doenças respiratórias dos répteis vêm obtendo grande sucesso. Assim, verifica-se a necessidade de padronização de novas técnicas de diagnóstico para o OPMV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo soroepidemiológico da infecção por paramixovírus ofídico em serpentes no CEVAP, através da detecção e quantificação de anticorpos anti-OPMV no soros de serpentes de várias espécies mantidas em diferentes condições de cativeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico e Autorização ética

Foram colhidos 0,5 mL de sangue total da veia caudal coccígea (Figura 1) de 175 serpentes cascavéis *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.), 24 jararacas (*Bothrops jararaca*), 8 jibóias *Boa constrictor constrictor* (B.c.c.) e 6 corn snake (*Pantherophis Guttatus*) provenientes do serpentário do CEVAP de Botucatu, SP. Além disso, 42 cascavéis *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) do Instituto Vital Brasil Niterói Rio de Janeiro e 32 do Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do IBAMA de Juiz de Fora, de Minas Gerais, e 15 serpentes C.d.t. recém chegadas da natureza que foram acompanhadas na Quarentena 1, Quarentena 2 e Baia coletiva do CEVAP. totalizando assim, 302 animais.



Figura 1: Coleta de sangue total de serpentes por meio punção da veia caudal coccígea.

Os tipos de cativeiro que foram evidenciados neste estudo receberam a denominação: 1) Baia - cativeiro semiextensivo (animais com convívio coletivo) do CEVAP; 3) – Museu – cativeiro intensivo (C.d.t Animais individualizados em baias individuais) do CEVAP 5) Quarentena 1: cativeiro intensivo (animais individualizados em caixas) do CEVAP na primeira fase de quarentena; 10) Rio de Janeiro - cativeiro

intensivo (animais individualizados em caixas) oriundos do Instituto Vital Brazil, RJ; 7) Museu - cativeiro intensivo (*B.c.c* animais individualizados em baias) do CEVAP, porém, são animais expostos para visitação pública; 8) Cativeiro intensivo - (*B. Jararaca* animais individualizados em caixas) do CEVAP 6) Natureza - serpentes recém-chegadas da natureza em cativeiro no CEVAP; 2) - Sala interna (cativeiro intensivo/animais individualizados em caixas) do CEVAP; 11) Minas Gerais - cativeiro semiextensivo do FUNED, MG; 4) Quarentena 2 - cativeiro intensivo (animais individualizados em caixas) do CEVAP em sua segunda fase de quarentena; 9) Museu – cativeiro intensivo (*P. guttatus* animais individualizados em baias) do CEVAP.

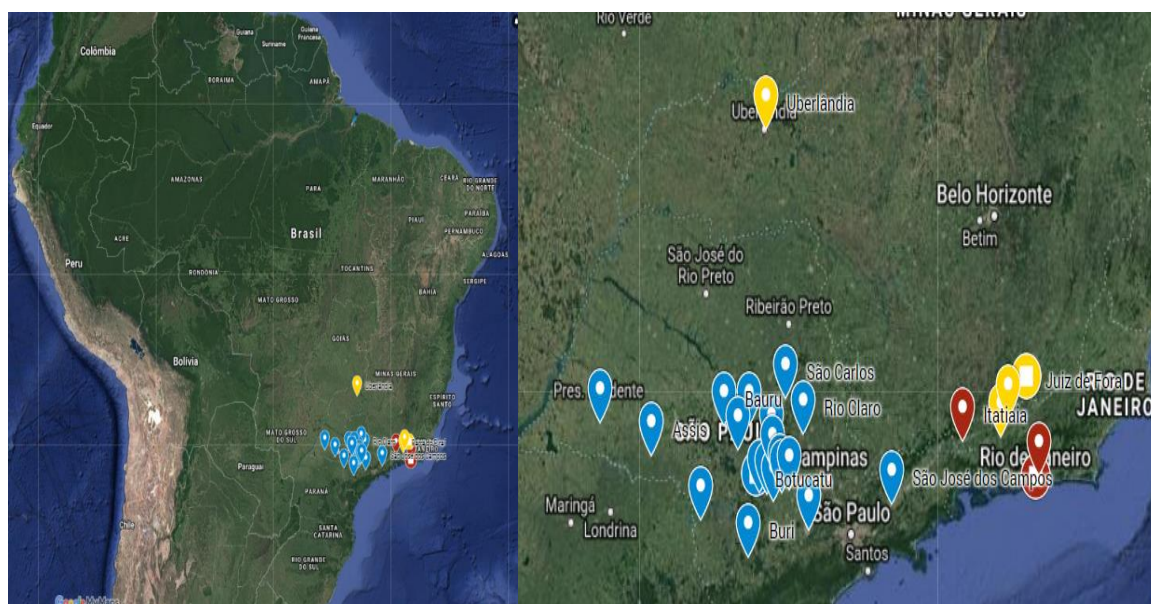


Figura 2: Mapa do Brasil, demonstrando a origem das serpentes na região sudeste.

Após a coleta de sangue destes animais, as amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro e imediatamente congelados em freezer a -20°C. Todos os procedimentos de coleta, manipulação dos animais e a autorização do uso do material biológico foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

do Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu, SP, mediante o número de processo 001/2018.

4.2 Cultivo de células Vero

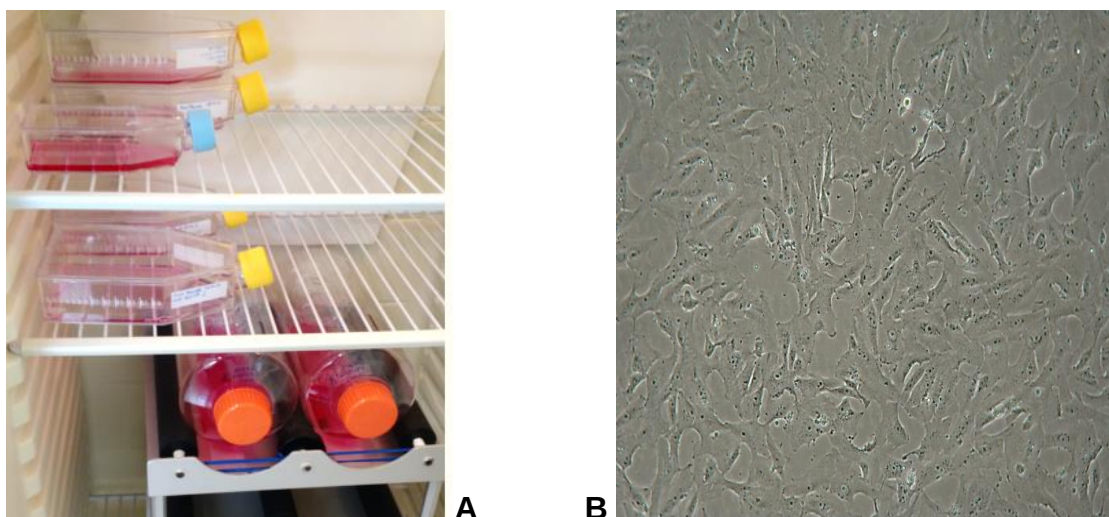


Figura 3. A: Garrafas e Rollers com células na estufa. **B:** Tapete de Células Vero.

A linhagem celular para a reprodução do *Paramyxovirus* foi a linhagem Vero proveniente do Instituto Adolf Lutz (Figura 2A e 2B). Inicialmente, cultivou-se células em garrafas de cultivo de 25 cm² contendo meio de cultura MEM (Meio Eagle modificado de Dulbecco – Gibco BRL), sendo que o preparo do meio de cultura, seguiu as orientações do fabricante, utilizando-se 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco BRL).

As passagens após confluência celular de 80% foram realizadas em fluxo laminar e em cada repique, utilizou-se 10 mL (9 mL do meio MEM e 1 mL do SFB) do meio de cultura e Tripsina 0,2% (m/v) para “descolar” o tapete celular. Após 48 horas, quando as células atingiram a confluência de 80% da superfície de cultivo, realizou-se uma nova passagem. Em caso de não confluência, realizou-se apenas a troca do meio de cultura até que a mesma estivesse apta ao novo repique. As

garrafas foram mantidas em estufa a 37°C. A medida em que o cultivo celular se expandiu, as células foram transferidas para garrafas de cultivo de 75cm² e 175cm², respectivamente. Quando as células atingiram a confluência de 80% de superfície nas garrafas de 175cm², elas foram transferidas para garrafa do tipo *roller* de 310cm² e 850cm², para obtenção de grande volume de células.

4.3 Cultivo do paramixovírus ofídico (OPMV)

Após a obtenção de um grande volume celular (Figura 4A e 4B), iniciou-se a inoculação viral do OPMV oriundos de amostras de soro de serpentes, extraídas de surtos anteriores do CEVAP, as quais estavam armazenadas no Laboratório de Microbiologia UNESP/Botucatu, SP.

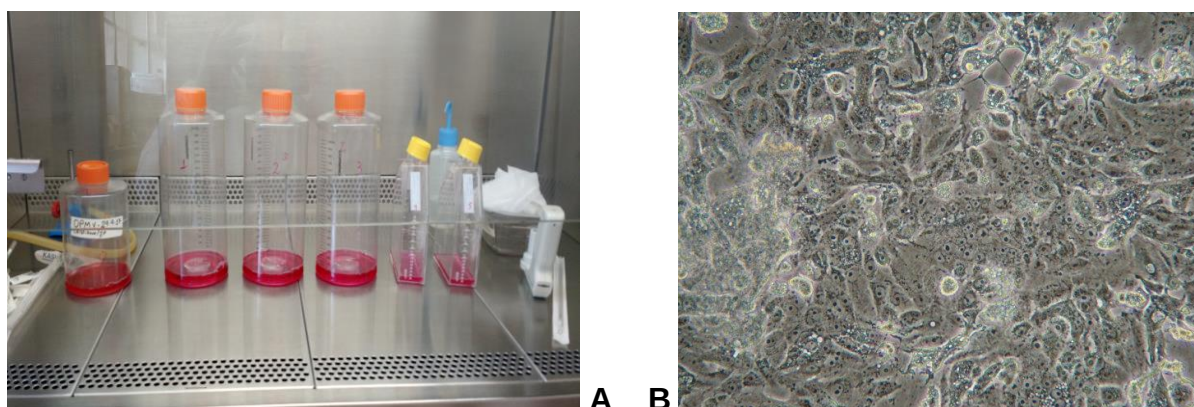


Figura 4. A: Frascos do tipo *Roller* e garrafas no fluxo laminar. **B:** Tapete de células Vero com efeito citopático.

A purificação do OPMV se deu pelo método de Hemaglutinação, com hemácias de galinha à 0,5% (m/v), tendo-se em vista que o *Paramyxovirus* ofídico apresenta atividade hemaglutinante, com boa titulação de 1/64. Para a inoculação do vírus na célula, o meio de cultura foi removido da garrafa de 25cm² onde se inoculou 500µL do vírus, deixando sob agitação por 30 minutos e, após este período, colocou-se o meio MEM contendo 1% (v/v) de Soro Fetal Bovino. As garrafas permaneceram na estufa em temperatura de 22°C por 10 dias para adaptação do

vírus, prazo adequado para a observação dos efeitos citopáticos, confirmando a expansão viral. Após a expansão viral em garrafas de 25cm², a cultura foi transferida para garrafas de 75cm², 175cm² e para *rollers* de 310cm² e 850 cm², respectivamente. Após se observar o efeito citopático, o volume do *roller* foi congelado no freezer -80°C, por uma semana. Após este período, descongelou-se o volume que foi aliquoteado em frações de 1mL em criotubos de 1,5 mL e congelado novamente no freezer -80°C.

4.4 Prova sorológica de Hemaglutinação para titulação do antígeno *Paramixovírus*



Figura 5: Coleta de sangue de galinha e o Teste de Hemaglutinação em microplacas de 96 cavidades fundo em “U”

Para realização da prova sorológica foram utilizados sangues de galinhas colhidos em solução de Alsever pH 6,1 na proporção de 1:1 e estocados à 4°C por no mínimo 24 horas e, não mais que 5 dias antes do uso. Estes sangues foram então lavados no mínimo 3 vezes em Phosphate Buffered Saline(PBS) e ressuspendidos para a purificação dos eritrócitos. Os testes foram realizados em microplacas de 96 cavidades com fundo em “U”, com volume final de 200µL (Figura 5).

Para a hemaglutinação, as suspensões a serem testadas foram diluídas em PBS na própria microplaca, em duplicata, desde 1/2 até 1/1024, deixando em cada cavidade 100 μ L de cada diluição e duas colunas (G e H), uma contendo apenas PBS (controle de sedimentação). Em seguida, 100 μ L de eritrócitos lavados foram adicionados a cada cavidade da microplaca, a qual foi incubada à temperatura ambiente em câmara úmida por 3 horas. Em seguida, foi então realizada a leitura da placa e determinação do título como a recíproca da maior diluição da amostra capaz de aglutinar eritrócitos de galinha. O título obtido na Hemaglutinação do OPMV forneceu uma unidade hemaglutinante (UH) de 1/64 para correção da inibição da hemaglutinação.

4.5 Ensaio de ELISA do tipo Bloqueio em Fase Líquida (BFL ELISA)



Figura 6. Pipetagem para o teste ELISA.

4.5.1 Padronização dos reagentes para BFL ELISA

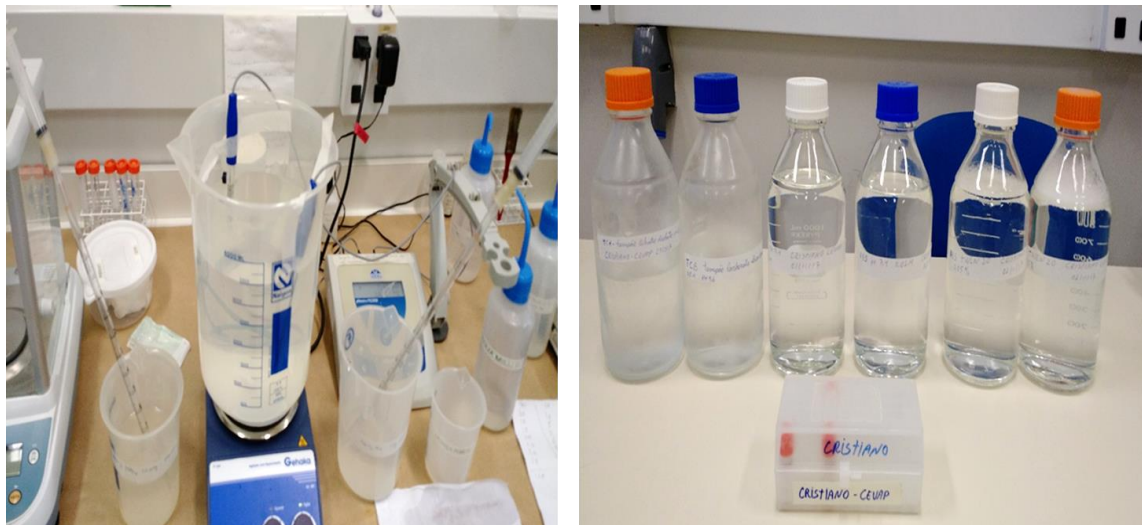


Figura 7: Reagentes para o BFL ELISA

Utilizou-se as seguintes soluções:

- Tampão Carbonato Bicarbonato (TCB) pH 9,6 à 0,05M
- Tampão Citrato Acetato (TCA) pH 6,0 à 0,1M
- Tampão Phosphate Buffered Saline(PBS) pH 7.4 à 0.01M.
- Tampão Phosphate Buffered Saline Tween (PBST) pH 7,4 0,01M à 0.05% (v/v) Tween 20.
- Cromógeno 10mg de TMB em 1mL de Dimethyl sulfoxide.
- Solução de bloqueio da reação: HCL 2M

4.5.2 Determinação da diluição ótima dos antissoros de captura e detector

A diluição ótima de reatividade dos antissoros de captura e detector foi determinada através do método ELISA indireto com anticorpo de captura. Para tanto, fez-se reagir três diluições do soro de captura de coelho (1:250, 1:500 e 1:1000), frente à duas diluições do soro detector de cobaio (1:100, 1:250) e as três diferentes diluições do antígeno SV (1:10, 1:20 e 1:40). A maior diluição dos soros de captura e detectores que apresentaram o máximo de densidade ótica (D.O.), sem apresentarem "ruídos" na reação foi tomado como ótima com o anticorpo de captura de coelho 1:500 e anticorpo detector de cobaio 1:250.

4.5.3 Determinação da diluição ótima do antígeno

A determinação da diluição ótima dos antígenos foi obtida mediante um ensaio de ELISA indireto com anticorpo de captura com as diluições ótimas dos antissoros de captura e detectores conforme anteriormente determinadas. As várias diluições dos antígenos (1:2 à 1:4096) foram colocadas a reagir em quadruplicata e, ao final da reação, tomou-se como diluição ótima 1:40, a qual apresentou uma D.O. próxima de 1,5.

4.5.4 Método de bloqueio em fase líquida (BFL-ELISA) para detecção de anticorpos contra OPMV em soros de cascavéis

4.5.4.1. Microplacas

Foram empregadas microplacas de 96 cavidades de fundo chato, da marca Maxisorp com certificado (039511). Para a fase líquida foram empregadas microplacas de 96 cavidades e fundo em “U” previamente bloqueadas com leite em pó desnatado à 10% (m/v) por 24 horas diluído em tampão carbonato-bicarbonato(TCB) 0,05 M pH 9,6.

4.5.4.2 Adsorção do anticorpo de captura

Os antissoros de coelho anti-OPMV foram diluídos na proporção de 1:500 com reatividade ótima em TCB e, em seguida, adicionados na quantidade de 100 uL em cada cavidade da microplaca. Esta foi então incubada por 18 horas à 4°C em câmara úmida, a fim de promover maior adsorção do antissoro.

4.5.4.3 Reação do soro teste versus OPMV em fase líquida

Simultaneamente à sensibilização das microplacas com anticorpo de captura, diluições dos soros de cascavéis de referência positivo e negativo foram feitas em PBST (0,01 M PO₄, 0,14 M NaCl pH 7,4, acrescido de 0,05 %(v/v) de Tween-20). Essas diluições foram feitas em placas rígidas de fundo em "U" e previamente incubadas para bloqueio com 200 uL de PBS 0,01 M PO₄, 0,14 M NaCl pH 7,4 acrescido de 10 % (m/v) de leite em pó desnatado por cavidade da placa durante 1 hora, a fim de evitar possíveis adsorções de antígenos ou anticorpos à mesma. Durante as diluições, tomou-se o cuidado de deixar em cada cavidade um volume de 100 µL por diluição, e também 14 cavidades com apenas 100 uL de PBST na ausência de soro, para atuar como controle positivo. Posteriormente, foram

acrescentadas em todas as cavidades da microplaca 100 uL da SV em diluição previamente estabelecida na proporção 1:20. A reação foi então incubada em câmara úmida por 18 horas e temperatura de 4°C.

4.5.4.4 Etapas de lavagens

Entre todas as fases da reação, as microplacas foram lavadas 5 vezes com PBST, a fim de se eliminar o excesso de reagentes da fase imediatamente anterior.

4.5.4.5 Bloqueio de ruídos da reação imunoenzimática

Com o objetivo de se eliminar possíveis "ruídos" na reação, cada cavidade da microplaca, após ter sido sensibilizada com o anticorpo de captura, cada cavidade foi recoberta com 300µL de leite em pó desnatado à 10%(m/v) diluído em TCB, permanecendo em câmara úmida por 1 hora à 37°C.

4.5.4.6 Titulação do OPMV residual após a reação de fase líquida

Para cada microplaca de ELISA foi transferido 100 uL de cada uma das diferentes diluições dos soros de cascavéis com a SV previamente incubados em fase líquida e, dos controles do antígeno contendo somente a SV sem soro. Em seguida, as microplacas foram incubadas por 1 hora à 37°C em câmara úmida. Na fase seguinte, cada cavidade das microplacas receberam 100 uL dos anticorpos detectores de cobaio anti-OPMV diluído à 1:250 em PBST contendo 10 % (m/v) de leite em pó desnatado (PBSTM). A microplaca foi então incubada em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Após essa fase, foi acrescentado a cada cavidade, 100 uL do conjugado imunoenzimático, que consistiu de IgG de coelho anti-IgG de cobaio marcada com peroxidase, diluído à 1:4000 no mesmo tampão do anticorpo detector. A reação foi então incubada nas mesmas condições anteriormente descritas e, finalmente à cada cavidade da microplaca, foi adicionado 100 uL de

uma solução contendo 2.5 uL de peróxido de hidrogênio à 30 % (m/v), 120uL de TMB à 10 mg/mL em 12 mL de tampão citrato-acetato 0,1 mol/L, pH 6,0. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente no agitador, a reação enzimática foi então bloqueada pela adição de 50 uL de HCl à 2 mol/L.

4.5.4.7 Leitura e interpretação dos resultados

As microplacas foram lidas utilizando-se um leitor de placas de ELISA (Titertek MULTISKAN-II) sob comprimento de onda de 450 nm contra um branco, no qual apenas o substrato e o bloqueador enzimático foram inseridos. Para o cálculo dos títulos dos soros no BFL-ELISA foram adotados os seguintes procedimentos: média aritmética das leituras das D.Os. das 14 cavidades onde foram colocados os controles positivos (sem soro ofídico) e os resultados observados em cada microplaca só foram aceitos quando o desvio padrão dessas repetições não ultrapassasse a razão 0,2.

4.5.4.8 Determinação da porcentagem de inibição de cada diluição

Para o cálculo da porcentagem de inibição de cada diluição foi aplicado a seguinte fórmula: $I = 100 - DA/MP \times 100$, onde DA = média das DOs observadas em cada diluição do soro teste; MP = média aritmética das leituras das D.Os. das 14 cavidades onde foram colocados os controles positivos (sem nenhum soro ofídico); I = % Inibição do soro teste.

4.6 Prova sorológica de Inibição de Hemaglutinação para a detecção de anticorpos anti-OPMV

Diluiu-se o sangue de galinha na proporção de 1:1 na solução de Alsever pH6,1 tindalizada. Utilizou-se 5 mL desta solução+sangue, para cada amostra, e

centrifugou-se por 5 minutos à 1800 rpm. Depois, desprezou-se o sobrenadante e foi adicionado PBS 1x. Repetiu-se este procedimento de lavagem 3 vezes, centrifugando na última vez à 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado. Utilizou-se 100µL destas hemácias lavadas em 20mL de PBS, para se obter uma concentração de 2% (m/v). A diluição das amostras de plasma foi 1:10 (0,1mL plasma+0,9mL PBS pH 7,0).

As amostras diluídas permaneceram no banho-maria à 56°C por 30 min, para inativar o sistema complemento. Para a adsorção das hemácias de galinha, a fim de eliminar reações inespecíficas, foi colocado o sedimento (hemácias) nas amostras (25µL por amostra) e incubou-se “overnight” à 5°C. A placa de 96 poços com o volume final de 150µL foi montada da seguinte forma: adicionou-se 50µL PBS em cada cavidade nas fileiras B-H, colocou-se 100µL da amostra na fileira A e, procedeu-se às diluições seriadas (50µL por cavidade), de 1/10 até 1/1280. Foi adicionada 4 unidades hemaglutinantes de vírus por cavidade (volume de 50µL, onde dilui-se o vírus com PBS) e foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. As hemáceas foram adicionadas, desta vez àquelas diluídas (50µL do preparado de hemácias e PBS em cada cavidade), e seguiu-se incubação à 5°C por 3 horas. Após este período realizou-se a leitura da placa. O valor obtido de inibição foi multiplicado por 4, referente as unidades hemaglutinantes.

Quando formou um botão avermelhado compacto no fundo de cada cavidade da placa, considerou-se o resultado positivo. Quando se formou a rede de hemaglutinação no fundo de cada cavidade da placa, considerou-se o resultado negativo. Algumas diluições, onde observou-se que não se formou o botão completo, nem a rede de hemaglutinação completa, foi considerada o valor

intermediário entre a última diluição com o botão completo e a próxima diluição onde formou-se a rede de hemaglutinação completa.

4.7 Análises estatísticas

A comparação entre as mesmas serpentes em ambientes diferentes foi feita com o teste de Friedman seguido do teste de Wilcoxon pareado, e a comparação entre as espécies e ambientes diferentes foi feita com o teste Anova seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

Análises foram realizadas com o software SPSS 21.0.

4.8 Tipos de Cativeiros do CEVAP

1) Quarentena: A serpente recém-capturada ou recém-adquirida é alojada neste setor para quarentena. Os animais recebem um microchip intradérmico e os dados como espécie, biometria, sexo, data de chegada e origem da captura, se são de coleção ou provenientes do meio Ambiente, são armazenados numa ficha juntamente com um número de registro ou RG da serpente. Os animais permanecem neste setor por 60 dias, dentro de uma caixa de polipropileno. Neste período, as serpentes recebem tratamento de desparasitação (ivermectina em duas doses de 0,2 mg/kg a cada 15 dias) para o controle de endoparasitas; triclorfon (1% [v/v]), a qual é aplicada por banhos de imersão e pulverização para controle de ectoparasitas. Após este período, as serpentes são enviadas para cativeiros semiextensivos ou intensivos.

2) Serpentário semiextensivo: este ambiente se caracteriza pelo fato dos animais viverem em baias coletivas com área fechada sem acesso à área externa, tendo o piso de cimento forrado com maravalha e livre acesso à água. Este serpentário é

equipado com resistências luminosas que emitem calor para aquecimento. A alimentação é coletiva, os camundongos são inseridos nas baias na quantidade de 1,5 por serpente e, após duas horas, os camundongos que não foram consumidos pelas serpentes, são removidos da baia. Atualmente, existem quatro baias com aproximadamente 50 animais por baia, totalizando 200 animais.

3) Cativeiro Intensivo: neste ambiente, as serpentes das espécies *Crotalus* e *Bothrops* permanecem alojadas em uma sala específica com controle de fluxo de pessoas, com barreiras sanitárias de pedilúvio na porta de entrada e, são confinadas individualmente em caixas de polipropileno com temperatura (25°C) e umidade (60%) controlados. Cada caixa, cujo tamanho varia diretamente com o tamanho da serpente, é forrado com papel Kraft, contendo um pote de água e o controle de alimentação individual é anotado em uma ficha localizada acima da caixa.

4) Museu ou serpentário vivo: neste ambiente, os animais são alojadas em baias individuais ou coletivas dependendo da espécie, com controle individual de alimentação. A temperatura é controlada pelo ar condicionado situado ao redor das baias. A Alimentação é individual e realizada mensalmente de forma idêntica aos cativeiros intensivos.

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de anticorpos por meio do ensaio de BFL-ELISA

Por meio do ensaio de BFL-ELISA utilizando-se o sangue de 287 serpentes, verificou-se a presença de anticorpos anti-OPMV nos animais das diferentes famílias: viperídeos, bóideos e colubrídeos. Também foram encontrados anticorpos nos diferentes tipos de cativeiros analisados neste trabalho, tanto cativeiro intensivo quanto no semiextensivo das dependências do CEVAP e da região Sudeste do Brasil.

No entanto, as maiores concentrações de anticorpos foram evidenciadas na espécie *C.d.t* da família dos viperídeos, independente do tipo de cativeiro. Contudo a espécie *C.d.t*, que era mantida no serpentário semiextensivo do cativeiro do CEVAP, obteve maior quantidade de anticorpos, com diferença significativa para a maioria dos outros setores. A menor concentração de anticorpos foi evidenciada na serpente *Corn snake* da família dos *colubridae* (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1: Número de amostras (n), Média e Erro Padrão da Porcentagem de Inibição do ensaio de BFL-ELISA das diferentes espécies de serpentes estudadas (287 serpentes totais), tipo de cativeiro e origem do cativeiro.

Espécie*	Tipo de Cativeiro/origem**	N Amostral	Média	Erro Padrão
G1 - <i>C.d.t</i>	Baia	40	76,88	7,79
G5 - <i>C.d.t</i>	Quarentena 1	40	75,35	12,31
G10 - <i>C.d.t</i>	Rio Janeiro	44	69,52	9,63
G3 - <i>C.d.t</i>	Museu	7	67,29	6,92
G6 - <i>C.d.t</i>	Natureza	17	67,29	7,53
G2 - <i>C.d.t</i>	Interna	43	65,42	10,75
G11 - <i>C.d.t</i>	Minas Gerais	30	63,53	9,59
G4 - <i>C.d.t</i>	Quarentena 2	27	62,22	9,43
G7 - <i>B.c.c</i>	Museu	8	53,5	9,57
G8 - <i>B. jararaca</i>	Interna	24	52,67	8,86
G9 - Corn snake	Museu	6	41,83	4,12

* *C.d.t.* = *Crotalus durissus terrificus*; *B.c.c.* = *Boa constrictor constrictor*; Corn snakes = *P. guttatus*, *B. Jararaca*= *Bothrops Jararaca*.

Grupos:

G1: Cativeiro semiextensivo (vários animais convivendo no mesmo ambiente) do CEVAP.

G2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9: Cativeiro intensivo (animais individualizados em caixas) do CEVAP.

G6: Serpentes recém-chegadas da natureza, antes da introdução nos cativeiros do CEVAP.

G10: Cativeiro intensivo (animais individualizados em caixas) do Instituto Vital Brasil (IVB) Niterói-RJ.

G11: Serpentes recém-capturadas da natureza CETAS IBAMA, Juiz de Fora, MG, encaminhadas ao IVB.

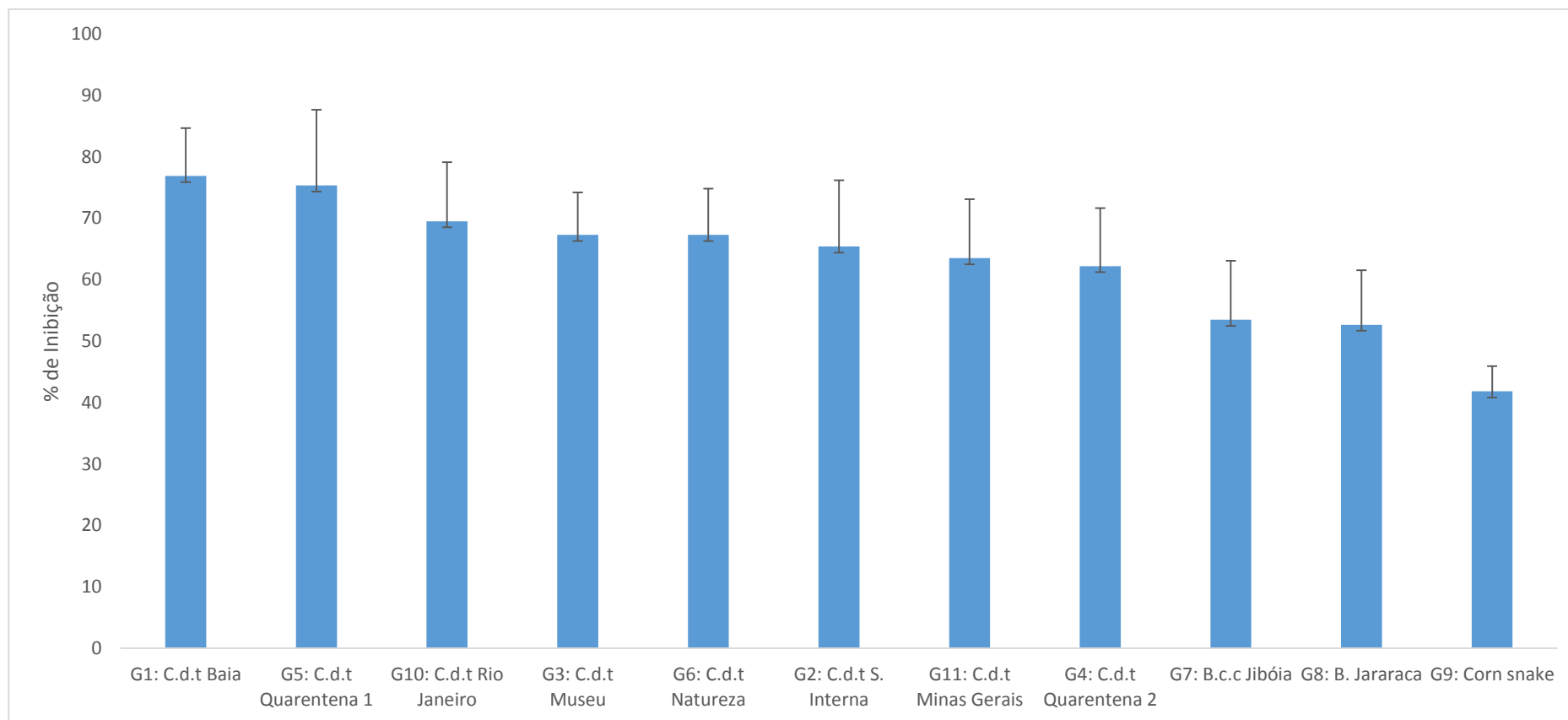


Gráfico 1: Média e desvio padrão da porcentagem de Inibição do Teste BFL-ELISA para quantificação de anticorpos anti-OPMV no sangue de diferentes espécies de serpentes de diferentes tipos de cativeiros.

Foram evidenciadas que a titulação de anticorpos contra o vírus OPMV encontrados nas serpentes *Corn Snake* (animais colubrídeos), jiboias (animais boídeos) e jararacas (animais viperídeos) do CEVAP, foram as menores porcentagens deste estudo quando comparados às cascavéis (Viperídeo), independente do tipo de cativeiro.

Quando a comparação é entre as serpentes da família Viperidae (cascavéis e jararacas), os resultados evidenciaram que as serpentes da espécie *B. jararaca* que vivem no serpentário intensivo, apresentam valores de concentração de anticorpos anti OPMV menores em relação à concentração dos mesmos anticorpos nas serpentes *C.d.t.* que vivem em outros tipos de cativeiro (manejo intensivo em caixas individuais, convívio coletivo em baias, sistemas de quarentena e Museu com visitação aberta ao público). Porém, quando a comparação dessa titulação de anticorpos anti-OPMV ocorre entre as cascavéis do cativeiro do CEVAP, nota-se uma diminuição significativa na quantidade de anticorpos nas serpentes da espécie *C.d.t.* quando estas migram do sistema de cativeiro Quarentena 1 para a Quarentena 2. As serpentes *C.d.t.* do cativeiro semiextensivo apresentam valores elevados e significativamente maiores quando comparado com oito dos onze grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2: Diferenças das médias ajustadas para porcentagem de inibição do ensaio de BFL-ELISA e comparação entre as espécies de serpentes e seus diferentes tipos de cativeiro e manejo (coletivo ou individual).

	G1: C.d.t Baia	G2: C.d.t Sala Interna	G3: C.d.t Museu	G4: C.d.t Quarentena 2	G5: C.d.t Quarentena 1	G6: C.d.t Natureza	G7: Jibóia	G8: B. jararaca	G9: Corn Snake	G10 C.d.t Rio Janeiro	G11: C.d.t Minas Gerais
C.d.t Baia	1,00										
C.d.t. S. Interna	11,46* p=0,00	1,00									
C.d.t Museu	9,59	-1,87	1,00								
C.d.t Quarentena 2	14,65* p=0,00	3,20	5,06	1,00							
C.d.t. Quarentena 1	1,53	-9,93* P=0,00	-8,06	-13,13* P=0,00	1,00						
C.d.t Natureza	9,58* P=0,30	-1,88	-0,01	-5,07	8,06	1,00					
Jibóia	23,37* P=0,00	11,92	13,79	8,72	21,85* P=0,00	13,79* P=0,40	1,00				
B. jararaca	24,21* P=0,00	12,75* P=0,00	14,62* P=0,22	9,56* P=0,22	22,68* P=0,00	14,63* P=0,00	0,83	1,00			
Corn Snake	35,04* P=0,00	23,59* P=0,00	25,45* P=0,00	20,39* P=0,00	33,52* P=0,00	25,46* P=0,00	11,67	10,83	1,00		
C.d.t Rio Janeiro	7,35* P=0,025	-4,10	-2,24	-7,30	5,83	-2,23	-16,02* P=0,01	-16,86* p=0,00	-27,69* P=0,00	1,00	
C.d.t Minas Gerais	13,34* P=0,00	1,89	3,75	-1,31	11,82* 0,00	3,76	-10,03	-10,87* P=0,00	-21,70* P=0,00	5,99	1,00

* Indica diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação entre os dois grupos Teste Anova seguido do teste Bonferroni para comparações múltiplas.

Quando se acompanhou as mesmas serpentes *C.d.t* em setores diferentes e realizou os ensaios de BFL-ELISA, verificou-se que, na transferência das serpentes da Quarentena 1 para a Quarentena 2, houve uma diminuição na porcentagem de inibição de anticorpos anti-OPMV, sem diferença significativa. No entanto, quando as serpentes *C.d.t* foram transferidas para o serpentário semiextensivo (convívio coletivo), houve um aumento significativo na quantidade de anticorpos, conforme evidenciado na Tabela 3 e Gráfico 2.

Tabela 3: Medidas de resumo numérico da porcentagem de inibição do ensaio de BFL-ELISA para cascavéis *C.d.t* submetidas aos três diferentes ambientes do CEVAP: Quarentena 1, Quarentena 2, Baia Coletiva. Comparação entre os grupos utilizando o teste Wilcoxon pareado.

	Quarentena 1	Quarentena 2	Baia Coletiva
Mediana (Min - Max)	72 (56-76) ^{ab}	68 (52-73) ^a	72 (57-90) ^b
Média (Erro Padrão)	68,4 (6,9)	65,9 (6,5)	73,0 (8,3)

Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença estatística ($p > 0,05$)
 Teste de Friedman seguido por Wilcoxon pareado. (N=11)

Tabela 4: Relação das serpentes *C.d.t* submetidas aos três diferentes ambientes do CEVAP: Quarentena1, Quarentena 2, Baia Coletiva.

Animal	Nº no estudo	Nº RG	Nº Microchip
1	216	4045	702502
2	228	4047	702318
3	239	4020	702044
4	254	4035	702486
5	260	4046	702323
6	266	4051	463170
7	267	4014	701851
8	242	4023	702209
9	259	4040	702017
10	241	4044	463325
11	253	4041	463307

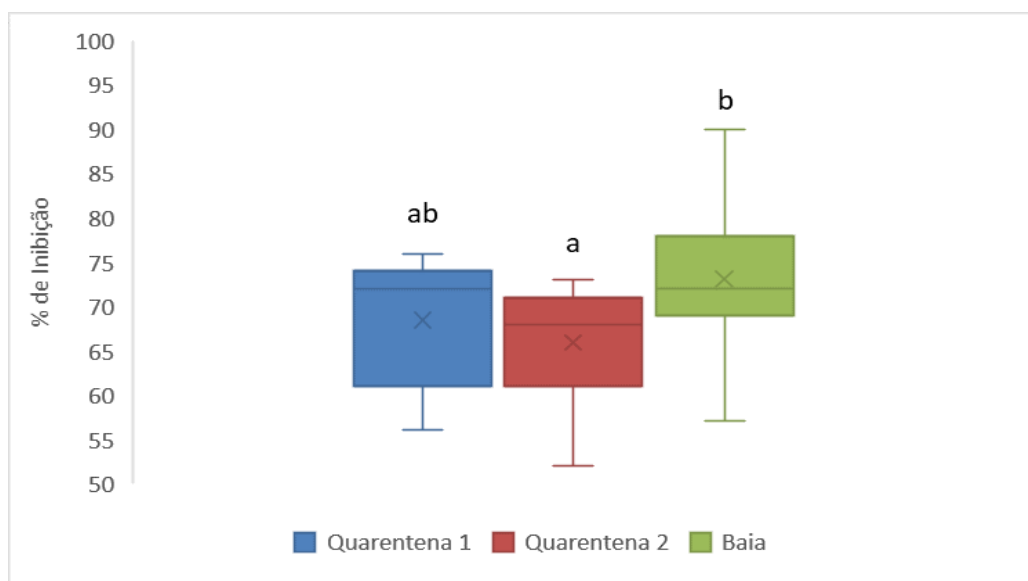


Gráfico 2: Distribuição da porcentagem de inibição para os mesmos animais submetidos a três ambientes diferentes. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença estatística ($p > 0,05$). (n11)

5.2. Quantificação de anticorpos por meio do Teste de Inibição de Hemaglutinação

Foi realizado o teste de Inibição de Hemaglutinação em 96 serpentes das 287 do presente estudo, onde se confirmou a presença de anticorpos nos soros destas serpentes como demonstrado no teste BFL-ELISA. No entanto, não houve correlação entre os valores.

Verificou-se um aumento significativo de anticorpos anti-OPMV nas serpentes *C.d.t.* do serpentário semiextensivo (Baia), em relação aos outros grupos (Tabela 5 e Gráfico 3).

Tabela 5: Número de Amostras (n), Média e Erro Padrão do teste de Inibição de Hemaglutinação em diferentes espécies e salas.

Espécie	n	Média	Erro Padrão
<i>C.d.t.</i> Baia	7	457,14 ^a	60,10
<i>C.d.t.</i> Quarentena1	28	116,67 ^b	64,92
<i>C.d.t.</i> Natureza	8	105,71 ^b	60,10
Corn Snake	5	103,33 ^b	45,90
<i>C.d.t.</i> Quarentena 2	7	101,43 ^b	30,05
<i>C.d.t.</i> Museu	6	75,00 ^b	56,22
<i>C.d.t.</i> Rio Janeiro	6	72,00 ^b	71,11
<i>B. jararaca</i>	10	70,00 ^b	64,92
<i>C.d.t.</i> Sala Interna	12	57,14 ^b	60,10
<i>C.d.t.</i> Minas Gerais	7	52,00 ^b	50,28

Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ($p > 0,05$)

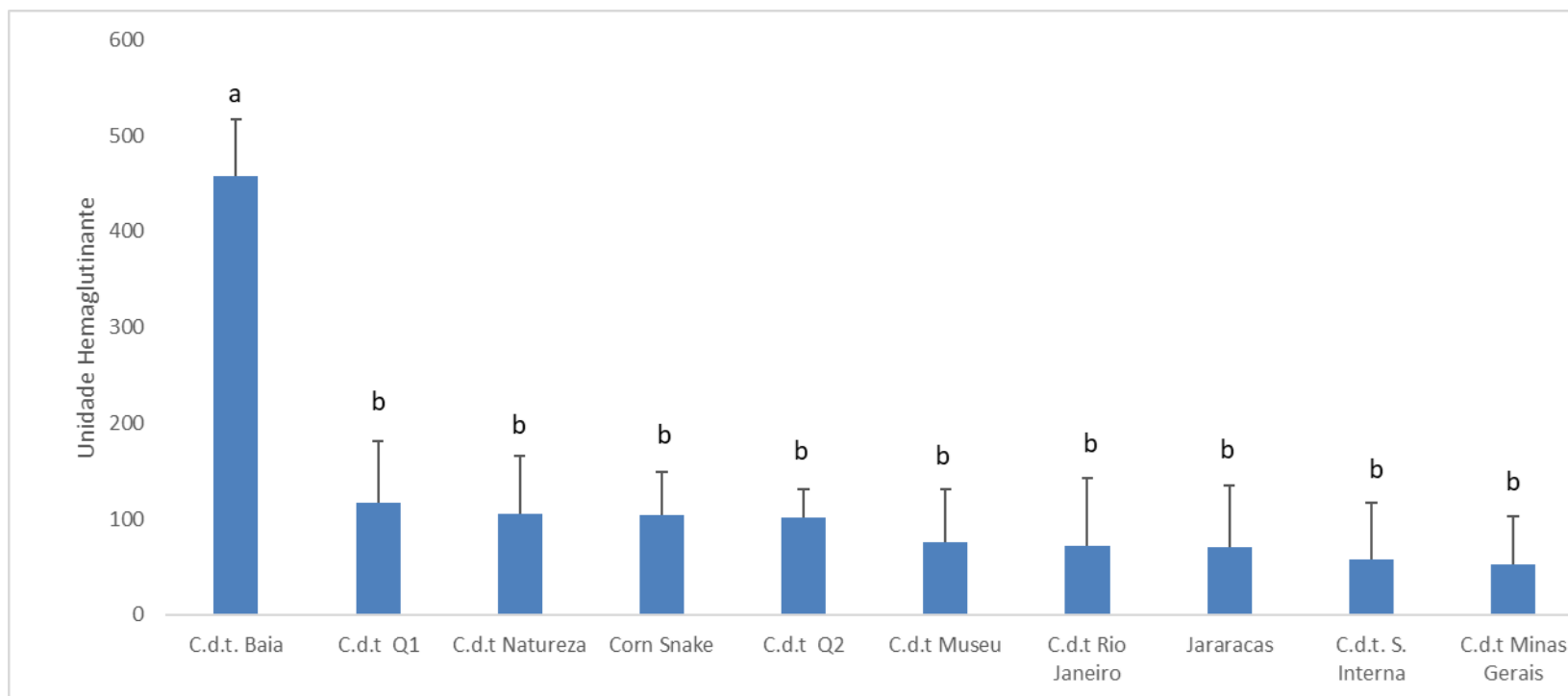


Gráfico 3: Média e erro padrão do teste de Inibição de Hemaglutinação. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A criação de serpentes em cativeiro é um grande desafio, pois estes animais podem apresentar a síndrome da má adaptação (23).

As principais causas de morte em cativeiro incluem condições inadequadas de confinamento, de metodologia errôneas de extração de veneno, nutrição inadequada e problemas de saúde que podem contribuir para a doença diretamente ou indiretamente por meio da imunossupressão associada ao estresse crônico e infecções adquiridas (4,53,54).

Dentre os agentes infecciosos, há um agente viral de ação devastadora sobre os plantéis de serpentes, o qual é um membro da família *Paramyxoviridae*, conhecido como *Ophidian Paramyxovirus* (OPMV) (6,-8) e que recentemente, foi denominado *Ferlavírus Reptiliano* (9). Mas apesar dos esforços científicos, ainda não se tem um protocolo de diagnóstico e tratamento específico para esta enfermidade em serpentes.

No presente estudo, foi avaliada a presença de anticorpos anti-OPMV, através dos testes de BFL-ELISA e HI em serpentes das famílias *Boidae*, *Viperidae* e *Colubridae*, as quais vivem em diferentes condições de cativeiro nos seguintes locais: Serpentário do CEVAP de Botucatu - SP, Serpentário do IVB, Niterói - RJ e CETAS do IBAMA de Juiz de Fora - MG.

Por meio do ensaio de BFL-ELISA em 302 serpentes, verificou-se a presença de anticorpos anti-OPMV nos animais das diferentes espécies e nos diferentes tipos de cativeiros intensivo e semiextensivo do CEVAP e da Região sudeste do Brasil, corroborando com os dados da literatura, o qual descreve a paramixovirose ofídica em colubrídeos, elapídeos, viperídeos, bóídeos e pitonídeos (45).

As maiores concentrações de anticorpos deste estudo foram evidenciadas na espécie *C.d.t* da família dos *viperídeos*, independente do tipo de cativeiro. Estes dados ratificam o que foi dito por Jacobson e colaboradores (11,32), onde as espécies do gênero *Crotalus* são particularmente suscetíveis à infecção pelo OPMV, em muitas situações, estas seriam as primeiras espécies a morrer.

Quando a comparação ocorreu entre as serpentes da mesma família *Viperidae* (cascavéis e jararacas), que vivem no serpentário intensivo do CEVAP, os resultados evidenciaram que a *B. jararaca* apresenta menor quantidade de anticorpos contra o paramixovírus em relação à *C.d.t.*, concordando com Jacobson (33) que afirma que a espécie *C.d.t* é mais suscetível a este tipo de infecção.

A menor concentração de anticorpos foi observada na *Corn Snake* da família dos Colubrídeos, as quais são mantidas no museu do CEVAP, e tem contato direto com os visitantes. Embora nunca houve surtos no CEVAP com esta espécie, Abbas e colaboradores (55) em 2011 descreveram um novo *Paramixovirus* encontrando em uma coleção individual da serpente *Corn Snake*. Portanto, apesar de baixas taxas de anticorpos, estes animais necessitam também de monitoramento constante.

Quando se comparou as *C.d.t* que vivem no cativeiro intensivo do CEVAP, notou-se uma diminuição na quantidade de anticorpos quando estas migram da Quarentena 1 para a Quarentena 2 e se mantém baixa na Sala interna (cativeiro intensivo). Estes resultados sugerem que, essa redução ocorra devido a adaptação ao cativeiro, ou seja, redução do estresse nas caixas individuais, as quais podem transmitir mais segurança ao animal e, promoção das barreiras físicas para o contágio de vírus, fungos e bactérias por outros animais.

Entre os cativeiros intensivos, o local de maior quantidade de anticorpos do CEVAP foi à Quarentena 1, talvez pelo estresse da captura e/ou pelo fato de o vírus

estar presente no local. Por este motivo, novos estudos devem ser feitos para detecção do vírus no ambiente pelo teste de PCR. Segundo Jacobson (56,57), um título crescente de anticorpos detectado pode indicar a exposição atual à *Paramixovírus*, enquanto um título que não aumenta, ou seja, permanece o mesmo ou diminui, pode ser indicativo de exposição prévia.

Sabe-se que a Quarentena do CEVAP é composto por sessenta dias, divididos em dois períodos de trinta dias, tempo abaixo do indicado na literatura. Vários investigadores indicaram que quarentenas de 90 dias são aconselháveis para a maioria dos répteis (58,59). Isso decorre do fato de que o *Paramixovírus* pode erradicar uma colônia de serpentes ou outros riscos virais. Alguns especialistas sugeriram que as serpentes fossem colocadas em quarentena por 180 dias (59-61). Dados da literatura apontam que alguns zoológicos particulares possuem protocolos que exigem títulos negativos de OPMV na Quarentena em répteis para a liberação de novas espécies para as coleções (46).

Comparando serpentes *C.d.t.* em relação ao tipo de cativeiro, intensivo e semiextensivo do CEVAP, observamos valores elevados e significativamente maiores de anticorpos nas serpentes do cativeiro semiextensivo. Estas serpentes apresentam valores maiores em relação a todos os grupos estudados, e significativamente maiores que oito dos onze grupos deste estudo. Como mencionado anteriormente, nas últimas duas décadas houveram quatro surtos de *Paramixovírus* nos anos de 1997, 2002, 2015 e 2016 no CEVAP.

No tipo de cativeiro semiextensivo, os animais estão em contato direto uns com os outros e com a mesma fonte de água, onde a possibilidade de contágio é maior (50). As excretas do trato digestivo também contribuem para a transmissão da virose, especialmente quando as serpentes defecam diretamente no bebedouro de

água. Neste caso, o vírus pode continuar viável por longos períodos de tempo (56). Então, acredita-se que este ambiente pode favorecer o contágio, pois o vírus é eliminado pela cloaca a partir de 28 dias de contágio (62).

Porém, Melgarejo (16) relata que o cativeiro semiextensivos onde se alojam grupos em condições similares, a existente na vida livre são vantajosos. Para Campagner (63), o cativeiro semiextensivo foi mais efetivo em virtude de apresentar controle superior da transmissão bacteriana e fúngica, gerenciamento mais fácil, menor custo e diminuição da taxa de mortalidade. No entanto, o cativeiro intensivo é amplamente adotado em serpentes reprodutoras para a produção de veneno (15-17).

No presente estudo, o cativeiro intensivo se mostrou mais seguro ao controle do *Paramixovírus*. Ao observar os resultados da Tabela 2, constatou-se que a quantidade de anticorpos nas serpentes da espécie *C.d.t.* da Quarentena 2 é menor que a Quarentena 1, porém são serpentes diferentes. Após esta constatação, propôs-se coletar soro e acompanhar as mesmas serpentes quando estas passam da Quarentena 1 para a 2 e depois para a Baia coletiva (cativeiro semiextensivo). Com essa dinâmica, confirmou-se que, realmente há uma diminuição de anticorpos quando estes mesmos animais passam para a Quarentena 2. No entanto quando estes animais chegam na baia, cativeiro semiextensivo, os anticorpos voltam a aumentar, superando a quarentena 1, com valores estatisticamente superiores.

Em jiboias, a quantidade de anticorpos foi significativamente inferior aos da espécie *C.d.t.* Estes dados corroboram com a literatura onde Jacobson e colaboradores (11, 33), afirmaram que a família *Viperidae* é a mais suscetível à infecção. Estes animais podem atuar como reservatórios do vírus. Desta forma,

considera-se que estes boídeos devem ter um cuidado especial no manejo para que evite a transferência de micro-organismos para outras serpentes, especialmente as serpentes da espécie *C.d.t.*

Após a constatação que as serpentes do CEVAP, independentemente da espécie e tipo de cativeiro, possuíam anticorpos anti-OPMV, resolveu-se analisar as serpentes capturadas na natureza antes do contato com o centro. Desta forma colheu-se sangue das *C.d.t* antes que os animais adentrassem a Quarentena 1 e, verificou-se que as mesmas também possuíam quantidades elevadas de anticorpos. Há poucos relatos do *Paramixovírus* em serpentes na natureza (64). Recentemente, identificaram-se massasaugas (*Sistrurus catenatus*) capturadas da natureza como positivas para a presença de anticorpos anti OPMV. A conclusão inicial foi que as serpentes foram expostas ao OPMV na natureza, porque os animais eram 100% soropositivos. Questionou-se a reação cruzada deste teste. No entanto, o achado de 100% de soro positividade para o OPMV em uma espécie ameaçada foi alarmante (65).

Após a constatação que os animais recém-chegados da natureza eram soropositivos, suspeitou-se que este vírus poderia estar circulante na macrorregião de Botucatu ou mesmo ser comum na natureza. Portanto, foram colhidos soros de animais de outros estados, Rio de Janeiro e Minas Gerais, onde confirmou-se a soro positividade dos mesmos, e a hipótese de que este vírus está circulante na natureza.

Através do teste de Inibição de Hemaglutinação neste estudo, observou-se também que, as maiores unidades Hemaglutinantes estão na família *Viperidae* na espécie *C.d.t.* do serpentário semiextensivo, com valores significativamente maiores

que todos os demais setores analisados, corroborando com os resultados encontrados através do teste BFL ELISA (Tabela 5 e Gráfico 3).

Embora se encontrasse anticorpos em todos os setores estudados através dos testes BFL ELISA e HI, estes resultados não apresentaram correlação direta, pois possuem sensibilidades diferentes. Os resultados elevados de HI corresponderam aos do BFL ELISA. No entanto, houve títulos elevados no BFL-ELISA que não foram elevados no HI. O Teste de HI tem sido questionado por alguns autores, segundo Allender (44). Pesquisas futuras devem elucidar outras técnicas para detectar e quantificar o Ac anti- OPMV para monitoramento de populações de serpentes da natureza.

Segundo Allender (46) alguns soros apresentaram títulos baixos (10) no teste de HI, que apresentam baixa reatividade e são difíceis de interpretar e poderiam perfeitamente ser resultado falso positivo. Os resultados demonstram que os testes de HI atuais não são confiáveis como um único teste diagnóstico.

Portanto, optamos neste estudo por verificar a presença de anticorpos primeiramente através do teste de BFL-ELISA, e utilizamos o HI como contraprova da soro positividade.

Um ponto fundamental para testar o soro através do BFL-ELISA é que o resultado não depende de interpretação pessoal, sendo o resultado dado por um leitor automático. Já para a HI, a interpretação pode levar a variabilidade dependente do critério adotado por cada pesquisador (48).

Apesar destas limitações existem relatórios que fornecem informações úteis sobre os títulos de HI que foram vistos durante um estudo controle de transmissão e também surtos de infecção por *Ferlavírus* (37). As limitações inerentes aos testes da

HI são reatividade cruzada entre vírus semelhantes e especificidade moderada, o que pode resultar em números excessivos de amostras falso-positivas (46).

Quando comparamos o BFL-ELISA com o HI, verifica-se que este último, apesar de simples e de menor custo, apresenta algumas limitações importantes. A principal delas é a detecção de apenas anticorpos dirigidos contra sítios hemaglutinantes do vírus, o que não acontece com o BFL-ELISA que detecta anticorpos contra qualquer epítipo viral. Outro fator importante é a necessidade, para o HI, de hemácias de galinha frescas que, em alguns laboratórios, podem ser uma grande limitação. Além disso, a suspensão viral para o HI perde título viral rapidamente devendo a titulação ser efetuada periodicamente. E, por fim, a facilidade que tem o BFL-ELISA em ser automatizado e processar rapidamente um grande número de amostras (48). Concluindo, o BFL-ELISA foi padronizado e apresentou uma série de vantagens sobre outros métodos de detecção de anticorpos contra o OPMV em soros de cascavéis (50).

Apesar dos resultados deste estudo, segundo PAIVA (50), ainda não se sabe se estes anticorpos são protetores ou apenas sinalizadores do contágio e se estes animais podem ser considerados como reservatórios da doença. O sistema imunológico dos répteis, quando estimulado, trabalha com a imunidade adquirida em longo prazo, aumentando a produção de anticorpos por mais de um ano, visto que estes animais possuem metabolismo basal lento (66).

O período de incubação das serpentes naturalmente infectadas pelo OPMV é incerto, mas situa-se entre 21 a 90 dias (67,68). Pôde-se observar que, a presença de anticorpos anti-OPMV nos animais avaliados é comum independente do local e do tipo de cativeiro. Acredita-se que isso ocorra, provavelmente, devido ao fato do vírus ser oportunista e estar circulante na natureza de forma endêmica, como

também estar circulante em cativeiros, o qual em consonância com a síndrome da má adaptação pode favorecer uma epidemia a qualquer momento.

Acredita-se que haja semelhança entre o paramixovírus ofídico com o paramixovírus canino do gênero *Morbilivírus*, vírus da cinomose canina (CDV), a qual é uma doença altamente contagiosa que acomete cães jovens, atingindo o sistema nervoso e respiratório, semelhante ao sintomas ocasionados pelo paramixovírus ofídico. Segundo Flores (69), estima-se que 70% dos cães urbanos possuam anticorpos contra o CDV. Esse vírus, assim como os outros agentes da traqueobronquite infecciosa canina, dissemina-se por via aérea e pelo contato direto ou indireto. A transmissão ocorre principalmente em ambientes de convívio entre cães, com superpopulação e estresse. Reinfecções com ou sem sinais clínicos podem ocorrer com frequência (69).

Baseado nestas informações é possível sugerir diante das condições do convívio coletivo do serpentário semiextensivo do CEVAP, que este ambiente propicia a infecção e reinfecção por paramixovirus pelos seguintes motivos:

a) Os animais vivem coletivamente, diferentemente da maneira isolada e intocada como eles estariam em vida livre na natureza, sendo esta condição uma fonte de estresse à este animal. Assim, o estresse pode levar o animal a ficar imunodeprimido;

b) O substrato utilizado atualmente nas baias coletivas no CEVAP é maravalha não esterilizado. Este substrato pode apresentar contaminantes com o fungos, vírus e bactérias. Outra fonte de contaminação presente nesta maravalha pode ser proveniente das fezes dos próprios animais, uma vez que esta maravalha é trocada a cada três meses, segundo os protocolos operacionais padrão do serpentário do CEVAP. Se houver fungos ou proliferação de fungos no substrato, pode também

causar infecções e lesões cutâneas. Nota-se que, este substrato também apresenta um pó fino, o qual pode eventualmente, causar lesões no sistema respiratório das serpentes, facilitando a infecção viral.

c) A alimentação não é controlada por animal. Atualmente, calcula-se um camundongo e meio para cada serpente. Porém, não é possível saber qual animal se alimentou. Além disso, as serpentes quando engolem um camundongo, podem ingerir também o substrato maravalha, e, caso esta esteja contaminada, pode contaminar também o sistema digestivo das serpentes.

d) A superfície do chão da baia do convívio coletivo não é aquecida. O aquecimento se dá por uma resistência luminosa 24 horas/diárias, fator este que, pode prejudicar o foto período dos animais. O contato com o ambiente natural (o sol, com o vento ou com a chuva) são restritivos aos animais de convívio coletivo. A falta de exposição ao sol, que é um antimicrobiano natural pode corroborar para a proliferação de agentes infecciosos.

Segundo a tríade epidemiológica agente-hospedeiro-ambiente, concluiu-se que o serpentário semiextensivo do CEVAP, pode favorecer a infecção por *Paramixovirus*, pois vários animais excretando vírus pela respiração ou pela cloaca pode aumentar a concentração do agente no ambiente. Esta opinião é corroborada por Pasmans e colaboradores (61), no qual se admite que o vírus seja facilmente transmitido por aerossol e contato.

Segundo Pasmans e colaboradores (61), para o manejo de répteis ser bem sucedido em cativeiro, é muito importante o papel veterinário no controle preventivo, ao impedir a entrada dos agentes infecciosos com controle de quarentena e desinfecção dos locais. No cativeiro intensivo há um maior controle da saúde das

serpentes pela presença das barreiras físicas das caixas individualizadas, o que reduz ou mesmo evita a transmissão dos patógenos (16).

A prevenção ainda é a única forma de se efetuar o controle da paramixovirose ofídica, pois não existe um tratamento específico para a enfermidade. A literatura cita períodos de quarentena longos, que vão de 30 dias até seis meses, o que encarece sobremaneira os criatórios. (44,45,68,70,71)

Seria de grande importância para a compreensão da infecção também como a otimização de procedimentos diagnósticos para aumentar a conhecimento sobre a patogênese e distribuição infecções por *Paramixovírus* (62).

No Brasil, apenas o estado de São Paulo, região sudeste do país, possui relatos da presença deste vírus (39, 43, 72).

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, sugerimos modificações no manejo de serpentes do CEVAP, tais como:

- Exames parasitários dos animais na quarentena do CEVAP quando estes animais chegam ao serpentário;
- Alojamentos exclusivos para os boídeos, separados dos viperídeos, uma vez que, acredita-se que estes sejam reservatórios do *Paramixovírus*;
- A mudança do substrato maravalha por papelão ondulado;
- A mudança do tipo de aquecimento do setor coletivo, substituindo a resistência luminosa por luz de cerâmica, a qual produz calor e não luminosidade, favorecendo assim o foto-período dos animais;
- O aquecimento do chão de cimento das baias coletivas com resistência embutida, já que as serpentes são animais ectotérmicos;

- O acesso dos animais do manejo coletivo à área externa das baias, propiciando o banho de sol e acesso ao clima exterior;
- Inserção de vasos de cerâmica dentro do manejo coletivo, para que os animais possam ficar entocados mimetizando o ambiente natural;
- Oferecimento de água corrente aos animais;
- O aumento de 60 para 90 dias na quarentena.
- A manipulação de boídeos na quarentena deve ser feita em um local e com equipamentos exclusivos.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos até o momento é possível concluir que:

- O *Paramixovírus* é endêmico na região Sudeste do Brasil, favorecendo o contato com as serpentes de vida livre com o vírus circulante na natureza.

- Os animais que apresentam maior porcentagem de anticorpos são as *C.d.t.* Entre os animais desta espécie, os que estão alojados no serpentário semiextensivo (manejo coletivo) apresentaram maiores porcentagens de anticorpos com diferença significativa em relação à maioria dos locais.

- O serpentário semiextensivo do CEVAP necessita de adequações físicas;

- Serpentes da espécie jiboia também apresentam anticorpos anti-OPMV, mas até o momento, não desenvolveram a doença no cativeiro do CEVAP. Acredita-se que estes animais atuam como reservatório do vírus. Portanto, medidas preventivas podem ser tomadas a fim de evitar o contágio.

- Entretanto, salienta-se que devido às características únicas deste vírus, estudos posteriores são necessários para elucidar se a presença de anticorpos anti-OPMV está relacionada à presença da doença ou do vírus nos animais.

8. REFERÊNCIAS

1. Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, Carneiro MTR, Medolago NB, Ferreira-Júnior RS, et al. A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 2015; 72(5 Suppl 1):AB271.
2. Murphy JB, Campbell JA. Captive maintenance. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS, editors. *Snakes: ecology and evolutionary biology*. New York: MacMillan Publ Co; 1987. p. 65-83.
3. Pough FH. Recommendations for the care of amphibians 285 and reptiles in academic institutions. *ILAR J*. 1991; 33(4):S1-2.
4. Cowan DF. Diseases of captive reptiles. *J Am Vet Med Assoc*. 1968; 153(7):848-59.
5. Jacobson, ER. Diseases of the respiratory system in reptiles. *Vet Med Small Anim Clinic*. 1978; 73(9):1169-75.
6. Foelsh DW, Leloup P. Fatale endemische infektion in einem serpentarium. *Tieraerztl*. 1976; 4(4):527-36.
7. Clark HF, Lief FS, Lunger PD, Waters D, Leloup P, Foelsch DW et al. Fer de Lance virus (FDLV): a probable paramyxovirus isolated from a reptile. *J Gen Virol*. 1979; 44(2):405-18.
8. Jacobson ER, Gaskin JM, Simpson CF, Terrell TG. Paramyxo-like virus infection in a rock rattlesnake. *J Am Vet Med Assoc*. 1980; 177(9):796-9.
9. International Committee on Taxonomy of Viruse (ICTV). *Virus taxonomy*. Birmingham: ICTV; 2018 [cited 2019 Jan 23]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
10. Cranfield MR, Graczyk TK. Ophidian paramyxovirus. In: Mader MR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders,1996. p. 858-861.
11. Jacobson ER, Gaskin JM, Page D, Iverson WO, Johnson JW. Illiness associated with paramyxo-like virus infection in a zoologic collection of snakes. *J Am Vet Med Assoc*. 1981; 179(11):1227-30.
12. Barraviera, B. 2011. How to overcome the gap between basic research and clinical trials? *J Venom Anim Toxins Trop Dis*. 2011; 17(4):361.

13. Warrel AD. Snake bite. Lancet. 2010; 375(9708):77–88.
14. Costa ACOR, Almeida-Santos SM, Germano VJ, Oliveira L, Scartozzoni RR, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I- a longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Publs. Av. Inst. Pau Brasil. 2005; 8-9:63-8.
15. Leloup P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. Acta Zool Pathol Antverp. 1984;78(1):177-98.
16. Melgarejo-Giménez AR. Criação e manejo de serpentes. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editors. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006. p. 175-99.
17. Leinz FF, Janeiro-Cinquini TRF, Ishizuka MM, Lang LV. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. Mem Inst Butantan. 1989; 51(1):33-8.
18. Braz HB, Rocha MMT, Furtado MFD. Maintaining rear-fanged snakes for venom production: an evaluation of mortality and survival rates for *Philodryas olfersii* and *P. patagoniensis* in captivity. J Venom Anim Toxins Trop Dis. 2012; 18(2):164-72.
19. Cowan DF. Adaptation, maladaptation and disease. In: Murphy JB, Collins JT, editors. Reproductive biology and diseases in captive reptiles. Ohio: Oxford; 1980. p. 191-6.
20. Schumacher J. Reptile respiratory medicine. Vet Clin Exot Anim. 2003; 6(1):213–31.
21. Schumacher J. Selected infectious disease of wild reptiles and amphibians. J. Exotic Pet Med. 2006; 15(1):18-24.
22. Marcus LC. Infectious diseases of reptiles. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1971; 159(11): 1626-31.
23. Belluomini HE, Saliba AM, Abe AS. Inquérito anatomopatológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* [Serpentes, Viperidae, Crotalinae]. Mem Inst Butantan. 1976/77; 40/41:123-8.
24. Kannene JB, Taylor RF, Sikarskie JG, Meyer TJ, Richter NA. Disease patterns in the Detroit Zoo: a study of reptilian and amphibian populations from 1973 through 1983. J Am Vet Med Assoc. 1985; 187(11):1132-3.

25. Frye FL. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd ed. Malabar: Krieger Publishing Co; 1991.
26. Murray MJ. Pneumonia and normal respiratory function. In: Mader MR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 1996. p. 396-405.
27. Burke TJ. Infectious diseases of reptiles. In: Fowler ME, editor. Zoo and wild animal medicine. Philadelphia: W. B. Saunders; 1978. p. 134-7.
28. Clark HF, Linger PD. Viruses. In: Cooper JE, Jackson OF, editors. Diseases of reptilia. London: Academic Press; 1981. p 135-64.
29. Ahne W, Neubert WJ, Thomsen I. Reptilian viruses: isolation of myxovirus-like particles from the snake *Elaphe oxycephala*. J Vet Med B. 1987; 34(1-10):607-12.
30. Potgieter LND, Sigler RE, Russell RG. Pneumonia in ottoman vipers (*Vipera xanthena xanthena*) associated with a Parainfluenza 2-like virus. J Wildl Dis. 1987; 23(3):355-60.
31. Ahne W, Scheinert P. Reptilian viruses: isolation of parvovirus-like particles from corn snake *Elapha guttata* (Colubridae). J Vet Med. 1989; 26(6):409-12.
32. Jacobson ER, Gaskin JM, Flanagan JP, Odum RA. Antibody responses of western diamondback rattlesnakes (*Crotalus atrox*) to inactivated ophidian paramyxovirus vaccines. J Zoo Wildl Med. 1991; 22(2):184-90.
33. Jacobson ER. Snakes. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1993; 23(6):1179-212.
34. Blahak S. Isolation and characterization of paramyxovirus from snakes and their relationship to avian Paramyxoviruses. J Vet Med B. 1995; 42(1-10):216-24.
35. Richter GA, Homer BL, Moyer SA, Williams DS, Scherba G, Tucker SJ et al. Characterization of paramyxoviruses isolated from three snakes. Virus Res. 1996; 43(1):77-83.
36. Cranfield MR, Graczyk TK. Ophidian paramyxovirus. In: Mader MR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. p.392-4.
37. Jacobson ER, Adams HP, Geisbert TW, Tucker SJ, Hall BJ, Homer BL. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. Vet Pathol. 1997; 34(5):450-9.

38. Kolesnikovas CK, Grego KF, Rameh de Albuquerque LC, Jacobson ER, Monezi TA, Mehnert DU et al. Ophidian paramyxovirus in brazilian vipers (*Bothrops alternatus*). Vet Rec. 2006; 159(12):390- 2.
39. Nogueira MF, Barrela TH, Silva RJ, Lopes CAM, Araújo Junior JP. Isolation of Paramyxovirus in a captive rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) from Botucatu, São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins Trop Dis. 2002; 8(1):141.
40. Papp T, Pees M, Schmidt V, Marschang RE. RT-PCR diagnosis followed by sequence characterization of paramyxoviruses in clinical samples from snakes reveals concurrent infections within populations and/or individuals. Vet Microbiol. 2010; 144(3-4):466-472.
41. Ahne W, Batts WN, Kurath G, Winton JR. Comparative sequence analyses of sixteen reptilian paramyxoviruses. Virus Res. 1999; 63(1-2):65-74.
42. Franke J, Essbauer S, Ahne W, Blahak S. Identification and molecular characterization of 18 paramyxoviruses isolated from snakes. Virus Res. 2001; 80(1-2):67-74.
43. Kolesnikovas CKM, Catão-Dias JL, Albuquerque LCR, Grego KF. Paramyxoviruses in *Bothrops alternatus* kept in captivity: morphological and molecular determination of the first data of OPMV in Brazil. Mem Inst Butantan. 2000-1; 59:143.
44. Bronson E, Cranfield MR. Paramyxovirus. In: Mader, DR, editor. Reptile medicine and surgery. St. Louis: Elsevier, 2006. p. 858-61.
45. Hyndman TH, Shilton CM, Marschang RE. Paramyxoviruses in reptiles: a review. 2013; 154(3-4):200-213.
46. Allender MC, Mitchell MA, Dreslik MJ, Phillips CA, Beasley VR. Measuring agreement and discord among hemagglutination inhibition assays against different ophidian paramyxovirus strains in the Eastern massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). J Zoo Wildl Med. 2008; 39(3):358-61.
47. Origi FC, Klein PA, Mathes K, Blahak S, Marschang RE, Tucker SJ et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises (Spur-thighed tortoise [*Testudo graeca*], and Hermann's tortoises [*Testudo hermanni*]). J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3156-63.
48. Araújo Junior JP. ELISA de bloqueio em fase líquida com diluição única para quantificação de anticorpos contra o paramyxovírus ofídico em soros de serpentes. [tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1996.

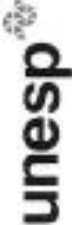
49. Kania SA, Kennedy MA, Nowin N, Diderrch VR, Ramsay E. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of ophidian paramyxovirus (OPV). *Infec Dis Rev*. 2000; 2(4):213-17.
50. Paiva MIS, Araújo Junior JP, Barraviera B. Serologic survey for ophidian paramyxovirus in captive snakes. *R Educ Contin Med Vet Zoot*. 2016; 14(1):22-27.
51. Gliński Z, Buczek J. Aspects of reptile immunity. *Med Weter*. 1999; 55(9):574-78.
52. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*. 1995; 16(8):392–98.
53. Biscola NP, Fornazari, F, Saad E, Richini-Pereira VB, Campagner MV, Langoni H et al. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesq Vet Bras*. 2011;31(9): 806–11.
54. Rosenthal LM, Mader DR .Microbiology. In: Mader MR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders,1996. p. 217-38.
55. Abbas MD, Marschang RE, Schmidt V, Kasper A, Papp T. A unique novel reptilian paramyxovirus, four atadenovirus types and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany, *Vet Microbiol*. 2012; 150(1-2):70-9.
56. Jacobson ER, editor. *Ophidian Paramyxovirus (OPMV)*. Florida: University of Florida; 2014 [cited 2019 Jan 24]. Available from: <http://labs.vetmed.ufl.edu/sample-requirements/microbiologyparasitology-serology/zoo-med-infections/opm/>.
57. Orrigi FC. Reptile immunology. In: Jacobson ER, editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles*. Florida: CRC Press; 2007. p. 131-66.
58. Rossi JV. General husbandry and management II. In: Mader MR, editor. *reptile medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders,1996.
59. Woodford MH, editor. *Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release into the wild*. Geneva: European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians; 2000 [cited 2019 Jan 24]. Available from: <http://digitalcommons.unl.edu/zoonoticpub/32/>
60. Jacobson ER, Gaskin JM, Wells S, Bowler K, Schumacher J. Epizootic of ophidian paramyxovirus in a zoological collection: pathological, microbiological, and serological findings. *J Zoo Wildl Med*. 1992; 23(3):318-27.

61. Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N. Introducing reptiles into a captive collection: the role of the veterinarian. *Vet J.* 2008; 175(1):53-68.
62. Pees M, Neul A, Müller K, Schmidt V, Truyen U, Leinecker N et al. Virus distribution and detection in corn snakes (*Pantherophis guttatus*) after experimental infection with three different ferlavirus strains. *Vet Microbiol.* 2016; 15(182):213-22.
63. Campagner MV, Bosco SM, Bagagli E, Cunha ML, Jeronimo BC, Saad E et al. Microbiological evaluation of different strategies for management of snakes in captivity. *J Toxicol Environ Health Sci.* 2012; 75(16-17): 1070-80.
64. Calle PP, Rivas J, Muñoz M, Thorbjarnarson J, Holmstrom W, Karesh WB. Infectious disease serologic survey in free-ranging venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). *J Zoo Wildlife Med.* 2001; 32(3):320–3.
65. Allender MC, Mitchell MA, Phillips CA, Gruszynski K, Beasley VR. Hematology, plasma biochemistry, and antibodies to select viruses in wild caught eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) from Illinois. *J Wildl Dis.* 2006;42(1):107–14.
66. Sandmeier FC, Tracy R, Dupré S, Hunter K. A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease. *Biol Open.* 2012; 1(11):1078-82.
67. Hernandez-Divers SJ. Appendix A: reptile viral diseases – summary table. In: Mader MR, editor. *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 1147-58.
68. Ritchie B. Virology. In: Mader, MR, editor. *Reptile medicine and surgery*. St.Louis: Elsevier; 2006. p. 391-417.
69. Flores EF, Traesel CK. Epidemiologia das infecções víricas. IN: Flores EF, editor. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p. 678.
70. Hyndman TH, Marschang RE, Wellehan-Junior JF, Nicholls PK. Isolation and molecular identification of Sunshine virus, a novel paramyxovirus found in Australian snakes. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(2): 1436–46.
71. Keeble E. Neurology. In: Girling S, Raiti P, editors. *BSAVA manual of reptiles*. Gloucester: Quedgeley; 2002. p. 273-88.

72. Azevedo ILJ, da Silva ARP, Carmona E, Ho PL. Characterization of a paramyxovirus from Fer de Lance viper (*Bothrops jararaca*): partial nucleotide sequence of putative fusion protein. Arch Virol. 2001; 146(1):51-57.

APÊNDICE I

Anexo I: Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do instituto de Biotecnologia da UNESP.

 CEUA IBTEC COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	 unesp	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu
CERTIFICADO Nº 001/2018 – CEUA		
Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica do Paramyxovirus em serpentes", Protocolo nº 001/2018, sob a responsabilidade de Lucilene Delazari dos Santos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP, nesta data.		
Finalidade: Vigência do Projeto:	() Ensino Início: 01/10/2018	(x) Pesquisa Científica Término: 28/02/2019
Foi autorizada a utilização de amostras biológicas (soro de animais) previamente coletadas. Caso seja necessária a utilização de mais amostras, deverá ser comunicado a esta CEUA.		
Botucatu, 13 de setembro de 2018		
 Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira Coordenador da CEUA		
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IBTEC Alameda das Tecumates, s/n, CEP: 19007-440 - Botucatu/SP - Brasil		