

PHILIPP RICARDO SCACIOTTE DE OLIVEIRA PAIVA

**Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes
naturalmente infectadas com *Cryptosporidium serpentis***

São Paulo

2012

PHILIPP RICARDO SCACIOTTE DE OLIVEIRA PAIVA

Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes naturalmente infectadas com *Cryptosporidium serpentis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2633
FMVZ

Paiva, Philipp Ricardo Scaciotte de Oliveira
Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes naturalmente infectadas
com *Cryptosporidium serpentis* / Philipp Ricardo Scaciotte de Oliveira Paiva. -- 2012.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

1. *Cryptosporidium*. 2. Serpentes. 3. Cativeiro. 4. ELISA indireto. 5. Sorologia.
I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PAIVA, Philipp Ricardo Scaciotte de Oliveira

Título: Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes naturalmente infectadas com *Cryptosporidium serpentis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____



**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“AVALIAÇÃO CLÍNICA, SOROLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE SERPENTES NATURALMENTE INFECTADAS COM *Cryptosporidium serpentis*”** sob responsabilidade da Prof. Adj Marcelo Vasconcelos Meireles e colaboração de Valéria Marçal Felix de Lima, Philipp Ricardo Scariotte de Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-002873.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010



Prof.ª Adj Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*Aos meus familiares
Pai e esposa, mãe (in memoriam), irmãos e sobrinha.
Por permitirem que eu seguisse meus caminhos sem contestação e
oferecendo-me apoio, palavras e sorrisos.*

*Aos amigos
que me incentivaram nos momentos de incertezas*

*A Leticia e toda família Beccari
Por me acolherem e me oferecerem uma segunda família.*

*A todos aqueles que estendem suas mãos
Seja para oferecer, para aceitar, para ajudar ou tão somente
agradecer.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade que me concederam de poder realizar este trabalho de mestrado.

Ao Instituto Butantan, especialmente ao Laboratório de Herpetologia, por possibilitar o desenvolvimento de parte do experimento e das técnicas empregadas, fornecendo as instalações necessárias, os animais envolvidos e todo o suporte técnico durante o experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por contribuir e possibilitar a realização de parte do experimento, disponibilizando laboratórios, materiais, e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pela orientação, incentivo e transferência de conhecimentos, pela amizade e companheirismo, paciência e compreensão, por não desistir das propostas e das pessoas e por ultrapassar as atribuições que são dadas aos orientadores, em favor do progresso pessoal e profissional dos seus alunos

À Prof. Dr^a Solange Maria Gennari, por ter aberto as portas do Departamento, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e da Universidade de São Paulo como um todo, possibilitando a realização deste projeto de pesquisa.

Ao diretor do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Wilson Fernandes, pelos anos de convivência, pela confiança depositada e por toda ajuda oferecida durante esse período.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan, Kathleen Fernandes Grego e Sávio Stefaninni Sant’Anna, pelos bons anos de convivência, pela amizade, ensinamentos, companheirismo e confiança em mim depositados.

Ao técnico de laboratório e aluno de Doutorado, Daniel Stuginski, pela grande ajuda fornecida, pela amizade e parceria e companheirismo.

A todos os demais pesquisadores, aprimorandos, técnicos e auxiliares do Laboratório de Herpetologia, sem exceção, por toda ajuda que me ofereceram durante este período.

À bióloga Cybele Lisboa, da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, por toda a ajuda disponibilizada.

Aos Professores do VPS, por cada aula que acompanhei no departamento, pela ajuda, pelas dicas, conselhos e pelos ensinamentos.

À técnica de Laboratório do LABMAS-VPS, Sheila Oliveira Silva, por toda ajuda oferecida.

Aos pós-graduandos do VPS, técnicos, secretários e demais funcionários do departamento e da FMVZ-USP, pelas aulas, pelos conhecimentos transferidos, pela ajuda oferecida e pelo apoio durante esse período.

À Prof. Dr^a Valéria Marçal Félix de Lima, pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto, orientando na padronização do ELISA, por ceder as instalações, equipamentos e materiais do laboratório de Imunologia da UNESP de Araçatuba, pelo conhecimento transferido, pela paciência e principalmente, pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Moraes Aoki, da empresa DNAPTA Biotecnologia LTDA, pela realização do SDS-PAGE e *Western Blotting* e purificação das IgY de galinhas, produzidas em ovos, utilizados neste experimento.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Ornipatologia e de Imunologia da FMVA-UNESP de Araçatuba: Camila Homem, Delvânia Carvalho, Milena Sato, Larissa

Melo e Kathleen Liezbeth, pela grande ajuda, ensinamentos e por todo o tempo de convivência

Ao amigo, doutorando Alex Akira Nakamura, por ter me recebido, oferecido sua residência, por toda ajuda e amizade, pelos ensinamentos e por cada dia que passamos juntos.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunologia e Ornitopatologia da FMVA-UNESP, sem exceção, por toda ajuda e pelos dias em que estivemos juntos.

À técnica de laboratório, Juliana Perosso por ter me acompanhado durante esse processo, pela ajuda prestada, paciência, ensinamentos e pela disponibilidade e incentivo.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ, “Virginie Buff D’Apice”, pela atenção e por toda a ajuda prestada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2010/57380-1)

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Mestrado concedida no período do projeto de pesquisa.

Aos demais funcionários e professores da FMVA da UNESP Campus Araçatuba, por toda a ajuda prestada.

A todos aqueles que tiveram participação direta ou indireta neste projeto de pesquisa.

EPÍGRAFE

*"Nenhum homem realmente produtivo
pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação."*

Albert Einstein

RESUMO

PAIVA, P. R. S. O. **Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes naturalmente infectadas com *Cryptosporidium serpentis***. [Clinical, serological and parasitological evaluation of snakes naturally infected with *Cryptosporidium serpentis*]. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A infecção por *Cryptosporidium serpentis* é uma das enfermidades mais importantes em répteis e se caracteriza por infecção crônica, clínica ou subclínica, e presença de gastrite hipertrófica severa, regurgitação, perda de peso progressiva, mortalidade eventual e eliminação contínua e intermitente de oocistos em fezes. O objetivo deste estudo foi padronizar um teste imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos contra *C. serpentis*, e acompanhar a evolução clínica, parasitológica e da resposta imune humoral em serpentes naturalmente infectadas com *C. serpentis*. Foram utilizadas 21 serpentes naturalmente infectadas com *C. serpentis* e alojadas no Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. As análises clínica e parasitológica foram realizadas em 21 serpentes por meio do registro diário dos sinais clínicos apresentados e pesquisa mensal da eliminação fecal de oocistos, em lâminas coradas pela técnica de Kinyoun. A avaliação sorológica foi realizada mensalmente utilizando o ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*C. serpentis*, pelo período de 12 meses em 8 animais, 8 meses em 3 animais e 6 meses em 1 animal. O ELISA indireto foi padronizado em bloco com utilização de antígeno produzido a partir de oocistos de *C. serpentis*, IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes e conjugado contendo IgG de coelho anti-IgY de galinha ligada à peroxidase. Os sintomas clínicos observados foram regurgitação, inapetência alimentar e perda de peso progressiva. A análise parasitológica revelou eliminação de quantidade variável de oocistos, de forma intermitente, em todas as serpentes, com positividade de 92% (116/126). O ELISA indireto apresentou positividade em 42,9% (54/126) das amostras. Foi observada resposta imune humoral na maioria dos animais, no entanto, com presença título flutuante de anticorpos e alternância de resultados positivos e negativos, em um mesmo animal.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Serpentes. Cativeiro. ELISA indireto. Sorologia.

ABSTRACT

PAIVA, P. R. S. O. **Clinical, serological and parasitological evaluation of snakes naturally infected with *Cryptosporidium serpentis***. [Avaliação clínica, sorológica e parasitológica de serpentes naturalmente infectadas com *Cryptosporidium serpentis*]. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Infection by *Cryptosporidium serpentis* is one of the most important diseases in reptiles, and is characterized by chronic infection, clinical or subclinical, and the presence of severe hypertrophic gastritis, food regurgitation, progressive weight loss, mortality, and intermittent and continuous shedding of oocysts in feces. The objective of this study was to standardize an indirect enzyme immunoassay (ELISA) to detect antibodies against *C. serpentis*, and evaluate the clinical, parasitological and humoral immune response in snakes naturally infected with *C. serpentis*. Twenty one snakes naturally infected with *C. serpentis* and housed at the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, were used for accomplish clinical and parasitological analyzes of *C. serpentis* infection, through the daily record of clinical signs and monthly survey of fecal shedding of oocysts using Kinyoun staining technique. The serological evaluation was performed monthly using the indirect ELISA for the detection of anti-*C. serpentis* antibodies, for a period of 12 months in eight animals, eight months in three animals, and six months in one animal. The indirect ELISA was standardized on the basis of *block* titration using antigen produced from oocysts of *C. serpentis*, chicken IgY anti-snake gamaglobulins and a conjugate containing rabbit IgG anti-chicken IgY linked to peroxidase. Clinical symptoms consisted in food regurgitation, inappetence, and progressive weight loss. The parasitological analysis revealed intermittent fecal shedding of variable number of oocysts in all snakes, with positivity in 92% (116/126) of the samples. The indirect ELISA was positive in 42.9% (54/126) of the samples. Humoral immune response was observed in most animals, however, fluctuating antibodies levels with rotation of positive and negative results were observed in some snakes.

Key words: *Cryptosporidium*. Captivity, Snakes. Indirect-ELISA. Serology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	26
Figura 2 - Esfregaço de fezes de serpentes naturalmente infectadas por <i>C. serpentis</i> - Coloração de Kinyoun.....	50
Figura 3 - Sinais clínicos e lesões macroscópicas em serpentes naturalmente infectadas por <i>C. serpentis</i>	52
Figura 4 - SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> mostrando reação da IgY de galinha contra gamaglobulinas de serpentes fragmentadas.....	53
Figura 5 - Resposta sorológica pelo ELISA indireto, em amostras de soro colhido com periodicidade mensal, em serpentes naturalmente infectadas por <i>Cryptosporidium serpentis</i>	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Relação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> atualmente descritas.....	25
Quadro 2 -	Relação das serpentes positivas para <i>Cryptosporidium serpentis</i> utilizadas para avaliação clínica, parasitológica e sorológica.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados do ELISA indireto, da avaliação semi-quantitativa da eliminação fecal de oocistos, peso corporal e sinais clínicos em serpentes naturalmente infectadas com <i>Cryptosporidium serpentis</i>	55
Tabela 2 -	Resultados da avaliação semi-quantitativa da eliminação fecal de oocistos, peso corporal e sinais clínicos em serpentes naturalmente infectadas por <i>Cryptosporidium serpentis</i>	57
Tabela 3 -	Densidade óptica dos soros das serpentes negativas e positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp., utilizados para controles positivos e negativos no ELISA indireto para detecção de anticorpo para <i>Cryptosporidium serpentis</i>	58
Tabela 4 -	Resultados da curva ROC para determinação da sensibilidade e da especificidade do ELISA indireto, em função da densidade óptica utilizada para determinação do ponto de corte.....	58
Tabela 5 -	Resultados da pesquisa de pesquisa de <i>C. serpentis</i> por meio de microscopia e ELISA indireto, em 126 amostras fecais ou de sangue de serpentes naturalmente infectadas por <i>C. serpentis</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	persulfato de amônio
BSA	bovine serum albumin – albumina do soro bovino
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade óptica
ELISA	ensaio imunoenzimático
EO	eliminação de oocistos
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
HSP	heat shock protein – proteína do choque térmico
Ig:	Imunoglobulina
kDA	Quilo Dalton
M	molar
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
n-PCR	<i>nested</i> -PCR
PBS	phosphate buffered saline - tampão fosfato-salino
PBS/T	tampão fosfato-salino + Tween [®] 20
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
rpm	rotação por minuto

s	segundos
SFB	soro fetal bovino
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
v/v	volume a volume
x	vezes
18S rRNA	gene da subunidade 18S do gene do rRNA

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	menos ou negativo
+	mais ou positivo
®	marca registrada
μ	micro

APÊNDICES

Apêndice A	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:50, 1:100, 1:200), das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:100, 1:200, 1:500), e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:1000) em placa de poliestireno padrão.....	77
Apêndice B	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:100, 1:200), das Igy de galinha anti-IgY de serpente (1:1000, 1:2000e 1:3000) e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada à peroxidase (1:5000), em placa de pliestireno padrão.....	77
Apêndice C	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:200, 1:400), das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000, 1:4000), e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), em placa de poliestireno padrão.....	78
Apêndice D	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente e de uma amostra positiva e uma amostra negativa (1:200, 1:400); das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000); e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), em placa de poliestireno padrão.....	78
Apêndice E	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno meia área e <i>colt</i> com 25µl.....	79
Apêndice F	Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno convencional e <i>colt</i> com 50 µl.....	79

Apêndice G Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno meia área e *colt* com 50µl.....

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em Répteis	23
1.1.1	Classificação das Espécies de <i>Cryptosporidium</i> em Répteis.....	23
1.1.2	Ciclo Biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	24
1.1.3	Adaptação a Hospedeiros e Especificidade por Espécies.....	26
1.1.4	Sinais clínicos e Alterações Patológicas.....	28
1.1.5	Importância econômica e em saúde pública.....	29
1.1.6	Resposta imune contra <i>Cryptosporidium</i> spp.....	31
1.1.7	Resposta Imune de Répteis.....	34
1.1.8	Ocorrência no Brasil.....	35
1.1.9	Métodos de detecção de anticorpos contra <i>Cryptosporidium</i>	35
1.1.10	Justificativa para o desenvolvimento do Projeto.....	36
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODO	39
3.1	Animais Utilizados e Manejo das Instalações	39
3.2	Avaliação sorológica	41
3.2.1	Colheita de Sangue	41
3.2.2	Ensaio Imunoenzimático Indireto.....	42
3.2.2.1	Obtenção do Antígeno de <i>Cryptosporidium serpentis</i>	42
3.2.2.2	Produção de IgY de Galinhas Anti-gamablobulinas de Serpentes.....	43

3.2.2.3	<i>Padronização do Ensaio Imunoenzimático ELISA-Indireto.....</i>	45
3.3	Avaliação Clínica, Parasitológica e Necroscópica	46
3.4	Classificação molecular de <i>Cryptosporidium serpentis</i>	47
3.5	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	49
4.1	Avaliação Clínica, Parasitológica e Necroscópica.....	49
4.2	Avaliação Sorológica	50
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

No Brasil são conhecidas 375 espécies de serpentes pertencentes a 10 famílias (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012). Dentre as famílias encontradas no Brasil, duas despertam maior interesse por sua importância médica em decorrência de acidentes ofídicos: *Viperidae*, com 28 espécies atualmente descritas, e que compreende o grupo das serpentes responsáveis pelo maior quantidade de acidentes ofídicos no Brasil (jararacas, surucucu-pico-de-jaca e cascavéis) e *Elapidae*, com 27 espécies, que compreende o grupo das corais verdadeiras. Segundo dados do Ministério da Saúde, 75% dos acidentes ofídicos são ocasionados por serpentes da família *Viperidae* e apenas 0,7% são ocasionados por serpentes da família *Elapidae* (BRASIL, 2008).

Embora as demais espécies de serpentes não despertem maior interesse em relação aos acidentes ofídicos, a manutenção dessas espécies merece atenção, pois uma grande variedade de serpentes, peçonhentas ou não peçonhentas, são mantidas em cativeiro, seja em plantéis de exposição em zoológicos e museus biológicos ou para pesquisas em diferentes áreas, como ecologia, fisiologia, dentre outras.

O Instituto Butantan, local onde os animais do experimento foram alojados, possui uma longa história na manutenção de serpentes em cativeiro. Fundado em 1901, teve como seu primeiro diretor o médico sanitário, Dr. Vital Brazil, que estabeleceu um sistema de permuta de animais venenosos por produtos biológicos, principalmente soro antiofídico e materiais utilizados em sua aplicação, junto a fazendeiros, sitiantes e demais pessoas do interior de São Paulo. Diariamente, um caminhão do Instituto percorria as estações terminais de todas as estradas de ferro paulista, recolhendo as caixas com serpentes (GREGO, 2000).

Estima-se que a quantidade total de serpentes recebidas pelo Instituto Butantan, nos primeiros 50 anos, ultrapasse 600.000 serpentes, mas esse número vem decaindo, ano a ano, devido à ação antrópica, à propagação de criadouros

particulares, por todo o território brasileiro, e à desativação do sistema de transporte de serpentes junto às linhas férreas. Por esse motivo, o interesse na reprodução de serpentes em cativeiro vem aumentando, visando à autossuficiência (GREGO, 2000).

Até a década de 60 as serpentes eram mantidas em serpentário externo do Instituto Butantan, onde os animais estavam sujeitos às variações ambientais, bem como ao contato direto com outras serpentes. A partir do ano de 1963 as serpentes passaram a ser mantidas em salas com aquecimento, embora não fossem individualizadas em gaiolas de criação; nesse caso, o número de óbitos ainda era bastante elevado. Foi a partir da década de 80 que diversas medidas de manejo foram implementadas, como individualização das serpentes em gaiolas, isolamento dos animais recém-chegados, em quarentenas, entre outras medidas profiláticas que favoreceram a redução do número de óbitos no plantel do Instituto (GREGO, 2000).

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

A infecção por *Cryptosporidium* foi descrita no começo do século XX por Ernest Edward Tyzzer (TYZZER, 1907), que relatou o primeiro caso de infecção pelo parasito, em glândulas gástricas de camundongos de laboratório, denominando-o como *Cryptosporidium muris*. Em 1912, o mesmo autor relatou a ocorrência de um protozoário semelhante a *C. muris*, no intestino delgado de camundongos e, após infecção experimental com o parasito, definiu infecções isoladas no estômago e no intestino com essa nova espécie, denominando-a como *Cryptosporidium parvum* (TYZZER, 1912).

Após o primeiro relato de Tyzzer (1907), atualmente 23 espécies do gênero *Cryptosporidium* são consideradas válidas em várias espécies animais (Quadro 1), incluindo aproximadamente 80 espécies de répteis (FAYER, 2010).

Existe ainda a classificação desse parasito como genótipos adaptados a diversos hospedeiros. Esses genótipos, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem dessas espécies na composição

genética. Devido à ausência de dados relacionados a outras características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (XIAO et al., 2002).

1.1 Infecção por *Cryptosporidium* em Répteis

O primeiro relato da infecção por *Cryptosporidium* em répteis foi feito por Brownstein et al. (1977) em 14 serpentes de três gêneros e quatro espécies (*Elaphe guttata*, *Elaphe subocularis*, *Crotalus horridus* e *Sansinia madagascarensis*) que apresentavam severa gastrite hipertrófica. Levine (1980) designou os isolados de serpentes como *C. serpentis*, com base no hospedeiro e nos relatos de Brownstein et al. (1977). Em 1998, Koudela e Modry (1998) denominaram como *C. saurophilum* os isolados obtidos de 67 espécies de 220 lagartos de vida livre ou em cativeiro.

Mais recentemente, *C. serpentis* foi encontrado em 25 de 44 amostras de várias espécies de serpentes, sendo que muitas apresentavam sinais clínicos e alterações patológicas (XIAO et al., 2004a) como as descritas por Brownstein et al. (1977).

1.1.1 Classificação das Espécies de *Cryptosporidium* em Répteis

Atualmente existem duas espécies de *Cryptosporidium* classificadas em répteis: *Cryptosporidium serpentis*, em serpentes, e *Cryptosporidium varanii* (em substituição a *Cryptosporidium saurophilum*) em lagartos, diferindo entre si na morfologia (oocistos de *C. serpentis* são maiores que os de *C. saurophilum*) e na localização (*C. serpentis* é um parasito gástrico, enquanto que *C. saurophilum* é um parasito intestinal) (XIAO et al., 2004a).

1.1.2 Ciclo Biológico de *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium é protozoário coccídio pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida e Família Cryptosporidiidae (FAYER, 2010).

São monoxênicos e se distinguem de outros coccídios por apresentarem oocistos sem esporocistos e presença de quatro esporozoítos, formação de um vacúolo parasitóforo na superfície da célula, além de ocorrência de auto-infecção por merozoítos de 1ª geração e pela excitação, dentro do hospedeiro, de oocistos de parede fina; há também produção de oocistos de parede espessa que são eliminados já esporulados, no meio ambiente, juntamente com as fezes (BOROWSKI et al., 2008).

Após ingestão dos oocistos esporulados, com quatro esporozoítos, ocorre a excitação, pela dissolução da sutura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos, que aderem à superfície das células epiteliais onde serão englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo; posteriormente, irão se diferenciar em trofozoítos e iniciar um processo de reprodução assexuada (merogonia ou esquizogonia). Na reprodução assexuada são formados os esquizontes de primeira geração, com oito merozoítos, que podem sofrer desenvolvimento cíclico, dando origem a esquizontes de primeira geração ou então prosseguem no ciclo, com formação de esquizontes de segunda geração, contendo quatro merozoítos (CURRENT et al., 1986; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004b; SMITH et al., 2007; FAYER, 2008).

Na reprodução sexuada os merontes tipo I dão origem aos merozoítos tipo I, que são liberados, aderem à superfície epitelial e originam os merontes tipo II; pode haver ainda uma terceira geração de merontes. O merozoítos tipo II ou III dão origem aos estágios sexuais, representados por microgametócitos e macrogametócitos; assim que ocorre a fertilização, há formação do zigoto e posteriormente diferenciação em oocistos de parede fina ou oocistos de parede espessa (Figura 1) .

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas

Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos (D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Sapo (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Várias espécies de aves (P)	Pavlásek (1999; 2001); Ryan et al. (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Várias espécies de aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tyzzler (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzler (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980); Tilley et al. (1990)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii*</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlásek et al. (1995); Pavlásek e Ryan (2008)
<i>C. viatorum</i>	Humanos (D)	Elwin et al. (2012)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

(Adaptado de XIAO; FAYER, 2008 e PLUTZER; KARANIS, 2009).

Principais sítios de infecção do parasito no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo ; TR-trato respiratório; *D-Desconhecido.

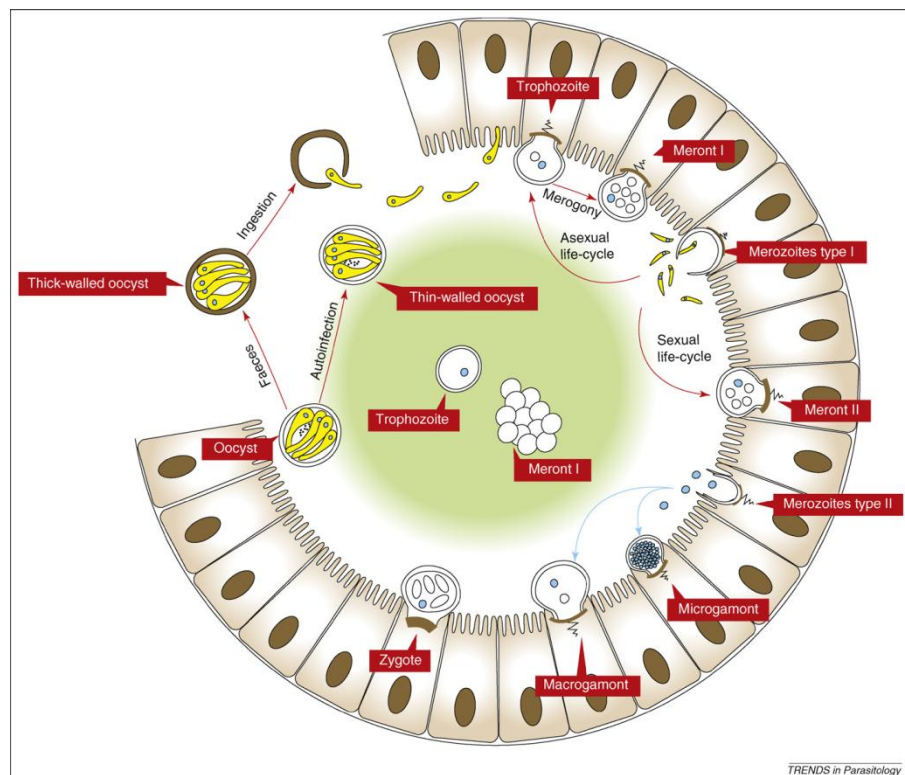
* Em substituição a *C. saurophilum*.

1.1.3 Adaptação a Hospedeiros e Especificidade por Espécies

Apesar de sua denominação, *C. serpentis* aparentemente também infecta lagartos. Por meio de análise de fragmentos do gene 18S rRNA de 24 amostras de diversas espécies de lagartos, foram identificados 10 animais parasitados por *C. serpentis*. Esse achado sugere que *C. serpentis* é tão comum em lagartos quanto *C. saurophilum* (XIAO et al., 2004a).

Koudela e Modry (1998) realizaram estudos em que oocistos de *C. saurophilum* foram inoculados em cinco gêneros de lagartos, sendo que todos desenvolveram infecção. Os oocistos também foram inoculados em serpentes, galinhas e camundongos, sem desenvolvimento de infecção. Por meio de análise morfométrica dos oocistos, do sítio de infecção e de estudos de transmissão cruzada, a denominação *C. saurophilum* foi proposta para esse isolado de lagartos.

Figura 1 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.



(BARTA; THOMPSON, 2006).

Diversos genótipos de *Cryptosporidium* têm sido identificados em serpentes e lagartos, por meio de análise molecular (XIAO et al., 2002). Mais espécies de *Cryptosporidium* podem estar presentes em répteis, já que Upton et al. (1989) e O'Donoghue (1995) identificaram pelo menos cinco morfotipos em répteis de cativeiro e selvagens, que poderiam ser genótipos diferentes ou apenas resultado da ingestão de oocistos de outras espécies presentes em presas ingeridas por esses animais (*Cryptosporidium muris* ou *Cryptosporidium* genótipo camundongo) e que passaram intactos pelo trato gastrointestinal.

Morgan et al. (1999) identificaram três genótipos distintos, em estudos com análise filogenética de sequencia de fragmento parcial da subunidade 18S do gene do rRNA: um morfologicamente relacionado a *C. serpentis* mas que, geneticamente, é muito parecido com o *C. muris*; outro genótipo encontrado está geneticamente em posição intermediária entre *C. serpentis* e *C. muris* e, por último, um genótipo designado como genótipo “camundongo”, que é morfologicamente similar a *C. parvum*, mas geneticamente distinto dessa espécie.

Xiao et al. (2004a), em estudo com base em biologia molecular, encontraram mais comumente, em serpentes e lagartos, infecção por *C. serpentis* e por *Cryptosporidium* genótipo monitor do deserto, que, segundo os autores, possivelmente poderia ser *C. saurophilum*. Três isolados de *Cryptosporidium*, encontrados em serpentes cativas, foram classificados como *C. muris* e *C. parvum* genótipo camundongo e *C. parvum* genótipo bovino, sendo provavelmente originados de alimento ingerido por esses animais. Ainda nesse estudo, foram encontrados quatro outros genótipos de *Cryptosporidium*, ainda não descritos: *Cryptosporidium* genótipo tartaruga, encontrado em tartarugas terrestres, dois novos genótipos de serpentes e um novo genótipo de *Cryptosporidium* em lagartos, todos geneticamente distintos, mas relacionados com *C. serpentis*.

Xiao et al. (2004a) encontraram em um lagarto monitor citaram um isolado de *Cryptosporidium*, na Nova Guiné, que pode representar uma nova espécie de

Cryptosporidium: *Cryptosporidium varanii*, encontrado em um lagarto monitor esmeralda (*Varanus prasinus*) parasitando o epitélio intestinal, principalmente em sua porção caudal. Essa espécie atualmente é considerada válida, em substituição a *C. saurophilum* (PAVLÁSEK; RYAN, 2008).

1.1.4 Sinais clínicos e Alterações Patológicas

Em serpentes, *Cryptosporidium* geralmente é encontrado em região gástrica, contudo algumas serpentes foram encontradas infectadas com *Cryptosporidium sp.* em localização restrita ao intestino (BROWER; CRANFIELD, 2001).

Quelônios podem ser infectados com formas distintas de *Cryptosporidium* gástrico e intestinal (XIAO et al., 2002) e geckos leopardo (*Eublepharis macularius*) pode desenvolver uma forma de criptosporidiose cloacal (O'DONOGHUE, 1995; XIAO et al., 2004b).

Diferentemente da criptosporidiose de mamíferos e aves, a infecção em répteis ocorre com maior frequência em serpentes adultas, o curso clínico é usualmente demorado, não é auto-limitante, com eliminação persistente de oocistos e, uma vez infectadas, a maioria das serpentes apresenta doença gástrica crônica (CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995).

Em serpentes, a criptosporidiose pode se manifestar de forma clínica ou subclínica. Algumas serpentes, mesmo sem manifestar sinais clínicos, podem desenvolver uma patologia severa (gastrite hipertrófica) com eliminação contínua e intermitente de oocistos, que pode perdurar anos (GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

Os sinais clínicos da criptosporidiose em répteis são diferentes daqueles encontrados em mamíferos e aves, que geralmente apresentam enterite aguda ou doença respiratória. Em serpentes, essa enfermidade se manifesta como gastrite, incluindo anorexia, regurgitação pós-prandial, letargia, perda progressiva de peso e aumento de volume em região mediana do corpo, de consistência firme, sendo geralmente fatal (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993;

O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999; RAMIREZ; 2004; XIAO et al., 2004b).

A infecção em lagartos resulta em anorexia, perda de peso, inchaço abdominal, letargia ou infecções gástricas subclínicas (DILLEHAY et al., 1986; O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999; RAMIREZ; 2004), podendo ocorrer mortalidade em alguns casos (DILLEHAY et al., 1986; CURRENT, 1999; XIAO et al., 2004a). Em quelônios foram descritos sinais de gastrite e regurgitação (O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999).

Quando ocorre a invasão celular, o parasito induz à proliferação das células da mucosa com atrofia das células granulares e das glândulas gástricas resultando em excesso na secreção de muco, hemorragias petequiais, gastrite hiperplásica e marcante aumento da espessura da parede estomacal, excessivo aumento da prega longitudinal, bem como o aumento do diâmetro do estômago com diminuição do lúmen gástrico (GODSHALK et al., 1986; O'DONOGHUE, 1995).

Exames post-mortem do estômago de serpentes revelaram marcante aumento da espessura da parede estomacal, com considerável estreitamento do lúmen (GODSHALK et al., 1986; O'DONOGHUE, 1995), assim como hemorragias petequiais, produção excessiva de muco e excessivo aumento da prega longitudinal (O'DONOGHUE, 1995). Em exame histopatológico, foi verificada a presença de inflamação, hiperplasia e hipertrofia das glândulas gástricas e edema da submucosa e lâmina própria, com infiltrado celular (GODSHALK et al., 1986; O'DONOGHUE, 1995).

1.1.5 Importância econômica e em saúde pública

Cryptosporidium spp. em répteis vem assumindo importância crescente nos criadouros conservacionistas e comerciais, centros de pesquisa e grandes coleções de serpentes, uma vez que, principalmente em serpentes, pode ser letal e dizimar toda a população existente nesses plantéis (CRANFIELD; GRACZYK, 1994; GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

Um surto de criptosporidiose em populações de serpentes cativas é potencialmente devastador, particularmente porque os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes à ação de diversos desinfetantes e terapias com fármacos não são efetivas no tratamento (CARMEL; GROVES, 1993; GRACZYK; CRANFIELD, 1998; CRANFIELD; GRACZYK, 2006).

Os oocistos de *Cryptosporidium* liberados pelas fezes de seus hospedeiros são muito resistentes às condições ambientais e podem ser transmitidos pela água, o que contribui para a disseminação do parasito em criatórios de animais (XIAO, 2004b).

De acordo com Graczyk e Cranfield (1998) não ocorre infecção em serpentes por isolados de mamíferos e aves, mas ocorre o desenvolvimento da infecção por oocistos isolados de diversos répteis. Essa informação é de extrema importância para os centros herpetológicos e criadouros diversos, uma vez que alguns abrigam uma grande variedade de répteis.

Em serpentes, a falta de um tratamento efetivo para criptosporidiose quase sempre resulta na eutanásia dos animais com o intuito de controlar a infecção no criatório, muitas vezes levando à perda de espécies importantes e raras do plantel (KIMBELL et al., 1999). Por esse motivo, é muito importante o controle da criptosporidiose em grandes centros que visam à extração de peçonha para posterior liofilização ou produção de vacinas, uma vez que um surto pode acabar com a toda coleção existente, levando assim a prejuízos inestimáveis.

No Brasil, o mercado de animais de estimação silvestres está em ascensão, principalmente o de serpentes e lagartos. Assim, criadouros comerciais desses animais devem também ter um controle da criptosporidiose, uma vez que pode ocorrer transmissão cruzada entre répteis (GRACZYK; CRANFIELD, 1998), levando assim a um grande prejuízo, com a perda principalmente de matrizes, uma vez que *Cryptosporidium* em répteis infecta com maior frequência animais adultos (CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995; XIAO et al., 2004; RAMIREZ; 2004).

O potencial zoonótico da criptosporidiose de répteis tem que ser estudado, uma vez que há poucos estudos de transmissão cruzada em mamíferos envolvendo amostras isoladas de répteis. Em estudo com transmissão experimental, Fayer et al. (1995) demonstraram que isolados de *C. serpentis* de serpentes não são infectantes para camundongos BALB/C.

Apesar de não haver comprovação de transmissão experimental de isolados de répteis para mamíferos, de acordo com Carmel e Groves (1993) as espécies de *Cryptosporidium* de répteis devem ser consideradas como potencialmente patogênicas para humanos. Essa afirmação é reforçada pelo fato de que recentemente Chen e Qiu (2012) relataram a presença de oocistos de *Cryptosporidium serpentis* em fezes de um bezerro que apresentava diarreia. As amostras foram analisadas pela *nested* PCR para amplificação de fragmentos do gene 18SrRNA e do gene da proteína de choque térmico (HSP70). Os oocistos obtidos de amostra fecal do bezerro foram então inoculados em camundongos de laboratório da linhagem BALB/c, imunocompetentes ou imunossuprimidos, quando houve desenvolvimento de infecção gástrica e eliminação de oocistos em fezes, o que demonstra que *C. serpentis* em algumas situações, pode se multiplicar em outros hospedeiros.

A detecção de infecção por *Cryptosporidium* em répteis é relevante em termos de saúde pública, uma vez que, com a liberação da venda desses animais, há um contato maior com o ser humano, aumentando assim o potencial zoonótico da infecção. Apesar da transmissão de *Cryptosporidium* de répteis para humanos não ser comprovada, existe a possibilidade de contaminação humana com outras espécies de *Cryptosporidium* que infectam o homem e que podem ser carreadas de forma passiva por répteis (GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

1.1.6 Resposta imune contra *Cryptosporidium* spp.

Como no ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. há duas etapas de auto-infecção promovida por merozoítos de 1ª geração e por excitação de oocistos de parede delgada (BOROWSKI et al., 2008), a severidade e duração da infecção

depende diretamente da resposta imunológica do hospedeiro (BORAD; WARD, 2010).

A maioria das informações disponíveis sobre a resposta imune contra *Cryptosporidium* spp. está relacionada à infecção intestinal em humanos e em camundongos. Apesar de ainda haver alguns aspectos não esclarecidos sobre imunidade contra *Cryptosporidium*, há participação de componentes das respostas imunes inata e adaptativa (BORAD; WARD, 2010; JALOVECKÁ et al., 2010; LEITCH; HE, 2012).

Na imunidade inata, que representa a defesa inicial contra a infecção e é importante para eliminação do parasito da superfície dos enterócitos, há participação de quimiocinas, receptores *Toll-like*, interleucinas, peptídeos antimicrobianos (α e β defensinas e catelicidinas), lecitina de ligação da manose, IFN- γ , prostaglandinas, substância P, óxido nítrico, células dendríticas, macrófagos, células *natural killer* (NK) e células gama delta ($\gamma\delta$) (PANTERBURG et al., 2010; BORAD; WARD, 2010; BEDI; MEAD, 2012; LEITCH; HE, 2012).

A resposta imune adaptativa celular contra *Cryptosporidium* é elaborada com participação de células CD-4, células CD-8, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10, e é o tipo de imunidade mais importante para o controle da enfermidade (BORAD; WARD, 2010; LEITCH; HE, 2012).

A importância de anticorpos anti-*Cryptosporidium* na resposta imune contra o parasito não está totalmente esclarecida. Aparentemente, anticorpos não são importantes para o controle da enfermidade, já que humanos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) apresentam enfermidade clínica crônica, mesmo com presença de altos títulos de anticorpos (PETRY et al., 2010), e camundongos com imunodeficiência relacionada aos linfócitos B não apresentaram maior susceptibilidade à infecção (CHEN et al., 2003).

Por outro lado, a eficácia da administração de colostro hiperimune proveniente de vacas imunizadas com antígenos de *C. parvum*, para profilaxia de

enfermidade clínica em bezerros (RIGGS, 2002) e tratamento de enfermidade clínica e subclínica em serpentes (GRACZYK et al., 1998) e lagartixa-leopardo (*Eublepharis macularius*) (GRACZYK et al., 1999), sugere que anticorpos também são importantes na resposta imunológica contra a infecção por *Cryptosporidium*, apesar de resultados limitados observados quando colostro hiperimune foi utilizado para tratamento de infecção por *C. parvum*, em ratos e camundongos (ABREU et al., 2003).

Apesar da indefinição sobre a importância de anticorpos na imunidade contra a criptosporidiose, a maioria dos estudos relacionados à administração de anticorpos passivos presentes em colostro, gemas de ovos e em suspensões de anticorpos mono ou policlonais mostraram eficácia pelo menos parcial na resolução da enfermidade (CRABB, 1998).

Há poucos estudos referentes à imunidade contra espécies de *Cryptosporidium* de localização gástrica, como *C. andersoni* e *C. muris* em mamíferos, *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves em aves, *C. fragile* em rãs e *C. serpentes*, em serpentes.

Algumas espécies gástricas de *Cryptosporidium* são responsáveis por infecções crônicas, clínicas ou subclínicas, que podem perdurar meses a anos, como é o caso de infecções por *C. andersoni* em bovinos (LINDSAY et al., 2000; KVÁC et al., 2008), *C. galli* em aves (ANTUNES et al., 2008; SILVA et al., 2010) e *C. serpentis* em serpentes (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993; GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

Provavelmente, na resposta imune em casos de criptosporidiose gástrica há participação de células CD-4 intestinais intra-epiteliais, uma vez que camundongos com imunodeficiência severa combinada infectados por *C. muris* e inoculados com células CD-4 intestinais intra-epiteliais provenientes de camundongos imunocompetentes previamente imunizados contra *C. muris* se recuperaram da infecção, enquanto que os animais que não receberam as células dos doadores desenvolveram infecção gástrica crônica (McDONALD et al., 1996).

Jalovecká et al. (2010) e Kvác et al. (2011) utilizaram camundongos como modelo experimental e observaram que na imunidade para controle da infecção gástrica por *C. muris* há participação importante de células CD-8, células CD-4 e linfócitos $\gamma\delta$.

Há produção de anticorpos anti-*C. serpentis* em serpentes com criptosporidiose gástrica clínica ou subclínica (GRACZYK; CRANFIELD, 1997), mas não há definição sobre a importância dos anticorpos na imunidade contra *C. serpentis*.

1.1.7 Resposta Imune de Répteis

Apesar de pouco estudada, em comparação à resposta imunológica de mamíferos, a resposta imunológica de répteis aparentemente apresenta células especializadas e moléculas efetoras que interagem de forma semelhante à observada em mamíferos. No entanto, os mecanismos exatos envolvidos na resposta imunológica desses animais ainda são pouco esclarecidos (ORIGGI, 2007).

A resposta por meio de ativação do sistema complemento em répteis é semelhante à observada em mamíferos (KOPPENHEFFER, 1987). Da mesma maneira, répteis apresentam linfócitos e monócitos similares aos mamíferos e aves (MONTALI, 1988).

Em répteis há três tipos de imunoglobulinas (IgY, IgD e IgM) (GAMBÓN-DEZA et al., 2012). Imunoglobulina (IgY) presente em gema de ovos de serpentes (*Elaphe guttata*), purificada por precipitação em polietilenoglicol e submetida a SDS-PAGE, apresenta peso molecular, em kDA, de 173,4, 57, 51,5, 37,3 e 22,6. O fragmento de 173,4 kDA corresponde ao anticorpo não fragmentado (HASSL, 2005).

Resposta imune humoral (inicialmente IgM e depois IgY) foi observada em serpentes (*Thamnophis ordinoides*), por meio de radioimunoeletroforese, 31 pós-inoculação de gamaglobulina humana, hemocianina ou ovoalbumina, com adjuvante completo de Freund, e persistiu por 992 dias (COE et al., 1976).

A temperatura influi no período e intensidade da resposta imune humoral e celular em iguanas (*Dipsosaurus dorsalis*) e tartarugas (*Chelydra serpentina*) (EVANS; COWLES, 1959; EVANS, 1963; BORYSENKO, 1969). A estação do ano também interfere na resposta imunológica de serpentes (EL RIDI et al., 1981).

Em colubrídeos (*Elaphe vulpina*, *E. obsoletae* *Coluber constrictor*) a inoculação de hemocianina ou albumina sérica bovina associadas ao adjuvante completo de Freund resultou em produção de anticorpos após quatro semanas, com persistência do título por três meses. Após imunização secundária, houve aumento do título de anticorpos, que foram detectados por mais quatro meses (SALANITRO; MINTON JR., 1973).

1.1.8 Ocorrência no Brasil

São raros os relatos de infecção por *Cryptosporidium* em répteis no território brasileiro. Karasawa et al. (2002) pesquisaram a ocorrência de *Cryptosporidium* no estado de São Paulo e encontraram serpentes (*Crotalus durissus terrificus*) positivas para *Cryptosporidium* sp.. Foram analisadas amostras fecais e de lavado intestinal de 50 animais. Em 14 animais foram encontrados oocistos, sendo observada eliminação intermitente que, segundo os autores, pode ter sido ocasionada pelo estresse de captura, pois alguns animais apresentaram negatividade na análise do lavado intestinal, mas quando amostras fecais foram analisadas após vários dias da chegada das serpentes o resultado foi positivo.

Em trabalho mais recente Sevá et al. (2011) encontraram positividade para *C. serpentis* em 16 (21,6%) de 74 recintos, em várias espécies de serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Dentre os recintos com animais positivos, em somente três havia serpentes com enfermidade clínica (uma *C. durissa*, uma *Lampropeltis mexicana* e uma *Epicrates crassus*) caracterizada por regurgitação e perda progressiva de peso.

1.1.9 Métodos de detecção de anticorpos contra *Cryptosporidium*

Métodos sorológicos não são comumente utilizados para diagnóstico de criptosporidiose, pois mesmo com utilização de antígenos pouco conservados um resultado positivo indica somente exposição ao gênero *Cryptosporidium* ou a espécies muito próximas geneticamente, já que há antígenos comuns entre diferentes espécies do parasito (GRACZYK et al., 1996a; ALLISON et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011; BORAD et al., 2012). Além disso, os anticorpos contra *Cryptosporidium* podem persistir por mais de 12 meses pós-infecção (O'DONOGHUE, 1995).

A maioria dos trabalhos que utilizam sorologia para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* estão relacionados ao ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto em bovinos (LORENZO-LORENZO, 1993; ARES-MAZÁS, 1999), humanos (ROBIN et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2007), gatos (LAPPIN et al., 1997) e aves (CURRENT; SNYDER, 1988).

O único trabalho para detecção de anticorpos *C. serpentis*, em serpentes, foi desenvolvido por Graczyk e Cranfield (1997) a partir de antígenos oriundos de oocistos e de outros estágios evolutivos de *C. serpentis*.

1.1.10 Justificativa para o desenvolvimento do projeto

A identificação da infecção por *Cryptosporidium* em répteis, por meio de sorologia, como proposto neste projeto, é inédita no Brasil. É importante ressaltar que o diagnóstico de criptosporidiose em serpentes por meio de detecção de oocistos ou DNA do parasito, em amostras fecais, é extremamente difícil, devido à eliminação intermitente e, na maioria dos casos, à pequena quantidade de oocistos nas fezes.

Não existe nenhum estudo mais abrangente na literatura sobre a epidemiologia da infecção pelo *Cryptosporidium* spp. em serpentes em cativeiro, silvestres ou exóticas. Esses animais, além de apresentarem morbidade e mortalidade na presença de criptosporidiose por *C. serpentis*, possivelmente poderiam servir como fonte de infecção de *Cryptosporidium* spp. para o homem,

uma vez que podem abrigar diversas espécies desse parasito, advindas principalmente da alimentação.

O desenvolvimento do presente projeto visa ao esclarecimento de alguns aspectos relacionados à biologia e epidemiologia desse parasito, em serpentes, com o intuito de fornecer subsídios para o controle da criptosporidiose em criatórios comerciais, zoológicos e em serpentários que visam à produção de soro-antiofídico.

2 OBJETIVOS

O projeto teve como objetivo padronizar um teste imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos contra *Cryptosporidium serpentis*, em serpentes, e acompanhar a evolução clínica, parasitológica e da resposta imune humoral em serpentes naturalmente infectadas com *C. serpentis*.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais Utilizados e Manejo das Instalações

Foram utilizadas 21 serpentes pertencentes a seis gêneros, cada um com uma espécie, naturalmente infectadas por *C. serpentis*, previamente alojadas em cativeiro e doadas ao Instituto Butantan. Em nove serpentes foi realizada avaliação clínica e parasitológica. Nas outras 12 serpentes foram realizadas análises clínica, parasitológica e sorológica (Quadro 2).

Logo após a chegada no Instituto as serpentes foram examinadas para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pela coloração de Kinyoun. As serpentes positivas foram isoladas das demais serpentes do plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em sala de criação com aquecimento e iluminação artificial, individualizadas em gaiolas padrão para manutenção de serpentes forradas com papelão corrugado e com um pote de água.

As serpentes foram alimentadas mensalmente com ratos ou camundongos disponibilizados pelo Biotério Central do Instituto Butantan, seguindo o cronograma vigente no Laboratório de Herpetologia. A quantidade de alimentação oferecida variava de acordo com o peso da serpente, sendo de 10% a 30% do peso do animal.

As serpentes que recusavam alimentação por um período superior a 60 dias foram submetidas à alimentação forçada, após serem adormecidas em um tambor com CO₂ saturado; posteriormente a alimentação foi introduzida, por via oral, com realização de massagem na região do estômago da serpente.

As serpentes foram examinadas diariamente e os dados referentes ao manejo, ecdise e sinais clínicos foram anotados em fichas individuais.

As serpentes foram transferidas para outra gaiola toda vez que defecavam,

regurgitavam o alimento ou quando as gaiolas apresentavam excesso de umidade, sinais de fungos no substrato e presença de larvas de insetos no interior das gaiolas.

Todo o material utilizado na manutenção das serpentes era de uso exclusivo do experimento, inclusive as gaiolas, ganchos herpetológicos, tubos e laços de contenção, para evitar que outras serpentes se infectassem durante a realização do projeto.

O descarte dos materiais contaminados foi realizado em saco de lixo branco, identificados e posteriormente depositados nos recintos para descarte de material biológico do Instituto Butantan. Os materiais reutilizáveis foram submetidos à fervura em água com hipoclorito de sódio 2,5%, por 30 minutos, antes de serem lavados. Ganchos herpetológicos, laços e tubos de contenção eram higienizados com peróxido de hidrogênio 20%, após o uso.

Quadro 2. Serpentes positivas para *Cryptosporidium serpentis* utilizadas para avaliação clínica, parasitológica e sorológica

Espécie	Código	Avaliação Clínica	Avaliação Parasitológica	Avaliação Sorológica
<i>Eunectes murinus</i>	Em 01	+	+	-
<i>Eunectes murinus</i>	Em 02	+	+	-
<i>Eunectes murinus</i>	Em 03	+	+	-
<i>Eunectes murinus</i>	Em 04	+	+	-
<i>Eunectes murinus</i>	Em 05	+	+	-
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg 01	+	+	+
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg 02	+	+	+
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg 03	+	+	-
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg 04	+	+	-
<i>Boa c. amarali</i>	Bca 01	+	+	-
<i>Epicrates c. cenchria</i>	Ecc 01	+	+	+
<i>Epicrates c. cenchria</i>	Ecc 02	+	+	-
<i>Python regius</i>	Pr 01	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 01	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 02	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 03	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 04	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 05	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 06	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj 07	+	+	+
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj08	+	+	+

3.2 Avaliação sorológica

Doze animais foram utilizados para verificação da resposta imune humoral contra *C. serpentis*, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto (Quadro 2).

3.2.1 Colheita de Sangue

Foi realizada a colheita de sangue por 12 meses em 8 animais, 8 meses em 3 animais e 6 meses em 1 animal (Tabela 1). A interrupção na colheita de alguns animais se deveu ao seu óbito. O soro das serpentes foi submetido ao ELISA indireto, conforme descrito no item 3.2.2.3.

Os animais foram contidos com auxílio de Laço de Lutz, e o sangue foi colhido da veia caudal, com agulha de 20 x 0,55 mm e seringa descartável de 3 ml, não heparinizada. O sangue deixado em repouso, até o dia seguinte, a 4°C, com posterior colheita do soro e armazenamento a -70°C.

3.2.2 Ensaio Imunoenzimático Indireto

O ELISA indireto foi padronizado com utilização de antígeno produzido a partir de oocistos de *C. serpentis*, IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes e conjugado composto por IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada à peroxidase.

3.2.2.1 Obtenção do Antígeno de *Cryptosporidium serpentis*

As amostras de fezes ou de conteúdo da regurgitação contendo oocistos de *C. serpentis* foram colhidos de serpentes naturalmente infectadas, com classificação prévia da espécie de *Cryptosporidium* por meio da reação em cadeia de polimerase e sequenciamento, e preservadas em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), a 4° C.

Após várias tentativas utilizando diversos métodos de concentração e purificação de oocistos, o método que resultou em oocistos em quantidade e pureza para obtenção do antígeno foi o seguinte: amostras fecais ou de conteúdo da regurgitação foram diluídas em tween 20 0,1% e coadas em tamis com porosidade decrescente, até 36 µm. A suspensão contendo os oocistos foi transferida para um tubo de 50 ml, acrescida de 3 volumes de percoll, homogeneizada em vortex e centrifugada a 800 g, por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi colhido, diluído em água deionizada e centrifugado, a 2.000 g, por 10 minutos, para retirada do percoll. Após esse processo, o sedimento obtido foi submetido à concentração por centrifugação em solução de percoll com diferentes gradientes de densidade, após adaptações no protocolo utilizado por Abassi et al. (2000). Os gradientes foram preparados em tubo de vidro transparente, de 15 ml, partindo de 2ml de solução de percoll puro, com densidade de 1,13, 2ml de solução de percoll com densidade de 1,09 (1,5mL percoll +0,5ml H₂O), 2ml de solução de percoll com densidade de 1,05

(0,7 percoll + 1.3 ml H₂O) e 2 ml solução de percoll 1,01 (0.1ml percoll + 1.9 ml H₂O) e 1 ml da amostra. Os tubos foram centrifugados a 1000g, por 30 minutos, a 4°C. Após centrifugação, as bandas contendo os oocistos foram coletadas, colocadas em tubo de 50ml e diluídas em água destilada até o volume de 50ml. Os tubos foram então centrifugados a 2000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi transferido para tubos eppendorf de 1,5ml, diluído em água destilada e centrifugado a 12000g, por 3 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento diluído novamente em água destilada. Esse processo foi repetido 3 vezes, para a retirada completa do percoll.

Após concentração e purificação, os oocistos ainda com presença de alguns debris e bactérias, foram diluídos em solução de hipoclorito de sódio 1,75%, por 15 minutos e centrifugados a 12000g, por 3 minutos; o pellet foi diluído em água destilada, homogeneizado em vortex e centrifugado a 12000g, por 3 minutos. Essa etapa foi repetida 5 vezes para a retirada do hipoclorito de sódio. Após esse processo, as amostras foram diluídas em PBS pH 7,2 e armazenadas a 4° C. A contagem do número de oocistos foi realizada em câmara de Neubauer.

Os oocistos resultantes do processo de purificação (7×10^6) foram submetidos à sonicação, por 5 ciclos de 3 minutos, em banho de gelo, até a lise completa dos oocistos. A suspensão contendo os oocistos rompidos foi utilizada como antígeno. A dosagem de proteína total da solução contendo o antígeno foi realizada com o *kit* BCA1 (Sigma).

3.2.2.2 Produção de IgY de Galinhas Anti-Gamaglobulinas de Serpentes

Para obtenção de gamaglobulinas de serpentes foram utilizadas 10 serpentes pertencentes às famílias Viperidae (três *Bothropoides jararaca* e três *Caudisona durissa*), Colubridae (duas *Pantherophis gutatta*) e Boidae (duas *Boa constrictor amarali*), alojadas no Biotério de Produção de Venenos do Instituto Butantan e negativas para *Cryptosporidium* spp., por meio de exame microscópico (coloração de Kinyoun) e *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA. De cada serpente foram colhidos 3 ml de sangue, uma

única vez, com o mesmo protocolo descrito no item 2.2.1., com formação de um *pool* com soro das diversas espécies.

A fração gamaglobulínica do *pool* de soro das serpentes negativas para *Cryptosporidium* spp. foi purificada por precipitação com sulfato de amônio 45% e centrifugada a 7.000 g, durante 30min. O sedimento resultante foi diluído em PBS, pH 7,2, transferido para uma membrana de diálise e submerso em tampão Tris-HCl 0,025M, pH 8,8, durante 18 horas, por duas vezes, para retirada do excesso de sulfato de amônio (HEBERT et al., 1973). A quantificação das gamaglobulinas de serpentes foi realizada com o *kit* BCA1 (Sigma, Saint Louis, EUA), resultando em 30,26 mg/ml.

Para produção da IgY anti-gamaglobulinas de serpentes, quatro poedeiras comerciais de ovos brancos, da linhagem Isa Babcock, foram inoculadas com 100 µg ou 500 µg de gamaglobulinas de serpentes (500 µl de PBS contendo as gamaglobulinas e 500 µl de adjuvante completo ou incompleto de Freund), via intramuscular, com quatro inoculações e intervalos de 10 dias; a primeira inoculação foi realizada com adjuvante completo de Freund e as restantes com adjuvante incompleto de Freund. Após aproximadamente sete dias da última inoculação a IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes foi purificada a partir das gemas de dois ovos de cada ave utilizando o Kit Pierce® Chicken IgY Purification Kit (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

Nos ovos das aves inoculadas com 500µg de imunoglobulinas de serpentes, o rendimento obtido após a purificação foi de 5,9mg/ml. Os ovos das aves inoculadas com 100µg de imunoglobulinas de serpentes, o rendimento foi de 6,52mg/ml.

A reatividade da IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes foi verificada por meio de SDS-PAGE sob condições desnaturantes e *Western Blotting* conforme descrição a seguir: imediatamente antes da aplicação das amostras no gel, elas foram aquecidas a 95°C, por 5 minutos, com adição de tampão (*5x sample buffer*, Thermo Scientific). Diferentes concentrações das gamaglobulinas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (*lower gel*: 4,6mL de água,

2,7mL de poliacrilamida 30%, 2,5mL de Tris 1,5M pH 8,8, 50CL de SDS 10%, 50µL de APS 10% e 10µL de TEMED; *stacking* gel: 2,7mL de água, 670µL de poliacrilamida 30%, 500µL de Tris 1M pH 6,8, 40µL de SDS, 40µL de APS 10% e 5µL de TEMED), corridas em tampão Tris-Glicina 1x e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 micron (Thermo Scientific). As membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T (Tris-HCl 20mM, NaCl 250mM, pH 7,5) com adição de tween 20 na concentração final de 0,05%, em 5% de leite. Foram então incubadas com IgY de galinhas, lavadas e reveladas. Os anticorpos ligados foram detectados com o Pierce® ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) e TMB (Sigma-Aldrich).

3.2.2.3 Padronização do ELISA Indireto

O ELISA indireto foi padronizado em bloco, em microplacas Costar®, modelo 3690. Os soros de 10 serpentes positivas para *C. serpentis* (4 *P. gutatta*, 2 *B. jararaca*, 2 *B. constrictor* e 2 *E. c. cenchria*) e negativas (item 2.2.2.2) para *Cryptosporidium* spp. foram diluídos na proporção de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. A IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes foi diluída na proporção 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000 e 1:3.000. O conjugado contendo IgG de coelho anti-IgY de galinhas conjugada à peroxidase (Sigma A9046 - Anti-chicken IgY, whole molecule, peroxidase) foi diluído na proporção de 1:1000, 1:3000 e 1:5000. As diferentes diluições do conjugado foram testadas com todas as diluições dos soros.

A escolha das melhores diluições foi determinada pela maior diferença nas densidades ópticas entre os controles positivo e negativo, e resultou na opção pela diluição de 1:400, para soros de serpentes, 1:3000, para IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes e de 1:5000 para a IgG de coelho anti-IgY de galinha, conjugada à peroxidase (Apêndices A a G).

Após a titulação em bloco, as reações foram realizadas nas seguintes condições: as placas de microtitulação foram revestidas com 50µl de tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, contendo antígenos de *C. serpentis* (10µg/ml) e incubadas, em temperatura ambiente, por toda a noite. As placas foram lavadas

quatro vezes com solução salina tamponada PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T) e posteriormente bloqueadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 150 µl de uma solução de PBS/soro fetal bovino 10% (PBS-SFB). Após o bloqueio, foi realizada nova lavagem com PBS-T e, a cada poço, foram adicionados 100 µl das amostras de soro de serpente, diluídas na proporção de 1:400, em uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino e 0,05% de Tween 20 (PBS-T/SFB), com incubação por 60 minutos, a 30°C. Após incubação, foram realizadas quatro lavagens com PBS-T, sendo então adicionados, a cada poço, 100 µl de IgY de galinha anti-gamaglobulinas de serpentes, diluída em PBS-T/SFB na proporção de 1:400, seguindo-se incubação por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS/T, foram adicionados 100 µl de conjugado contendo IgG de coelho anti-IgY de galinha, conjugada à peroxidase, diluído em PBS-T/SFB, na proporção de 1:5000. Após 60 minutos em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS/T, por quatro vezes, e reveladas com 100 µl de o-phenylenediamine (OPD), em tampão contendo fosfato de sódio, ácido cítrico e peróxido de hidrogênio, ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada com adição de 50µl de ácido clorídrico 16%, por poço.

A densidade óptica foi avaliada com auxílio de leitor automático de microplacas iMARK (Bio-rad) e analisadas no programa Microplate Manager 6W (Bio-Rad), com comprimento de onda de 490 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e, em todas as placas, foi adicionado o branco (todos os reagentes menos o soro de serpente) e os controles positivo e negativo.

3.3 Avaliação Clínica, Parasitológica e Necroscópica

A avaliação clínica foi realizada diariamente, em todos os animais (Quadro 2) durante o manejo, com observação da presença de qualquer alteração física ou comportamental, incluindo regurgitação de alimento, inapetência alimentar, disecidise, coloração e presença de úlceras e conteúdo caseoso em mucosa oral, presença de muco ou sangue em fezes e em conteúdo regurgitado e dermatite.

A determinação do peso corporal foi realizada no início do experimento e a cada 6 ou 12 meses, com exceção dos animais que vieram a óbito (Tabelas 1 e 2).

A avaliação parasitológica também foi realizada em todos os animais. As amostras fecais foram coadas com auxílio de gaze dobrada, centrifugadas a 1500 g, por 10 minutos, e coradas pela técnica de Kinyoun, que também foi utilizada para coloração de esfregaços de material regurgitado.

As serpentes que vieram a óbito durante o experimento foram pesadas e, quando possível, foi realizada a necropsia pela veterinária do Laboratório de Herpetologia. Os animais que estavam em estado de autólise foram descartados, de acordo com o protocolo do laboratório.

3.4 Classificação molecular de *Cryptosporidium serpentis*

A classificação molecular foi realizada para identificação da espécie de *Cryptosporidium*, no início e no final do experimento. O DNA genômico presente em oocistos foi extraído de amostras fecais utilizando o QIAamp DNA Stool Mini Kit, de acordo o protocolo do fabricante, após passo inicial de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, por 5 vezes. Para identificação do parasito foi realizada a *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (XIAO et al., 2000), seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados.

3.5 Análise Estatística

A proporção de concordância entre o exame microscópico e o ELISA indireto foi determinada pelo cálculo do coeficiente Kappa (PEREIRA, 1995).

O cálculo da sensibilidade dos dois métodos foi realizado de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{(\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

O valor do ponto de corte definido no ELISA indireto foi calculado pela curva ROC (*receiver operator characteristic*), utilizando o valor da média da densidade óptica de 10 amostras positivas e 10 amostras negativas para *Cryptosporidium* spp., utilizando o programa estatístico GraphPad Prisma 5.0.

4 RESULTADOS

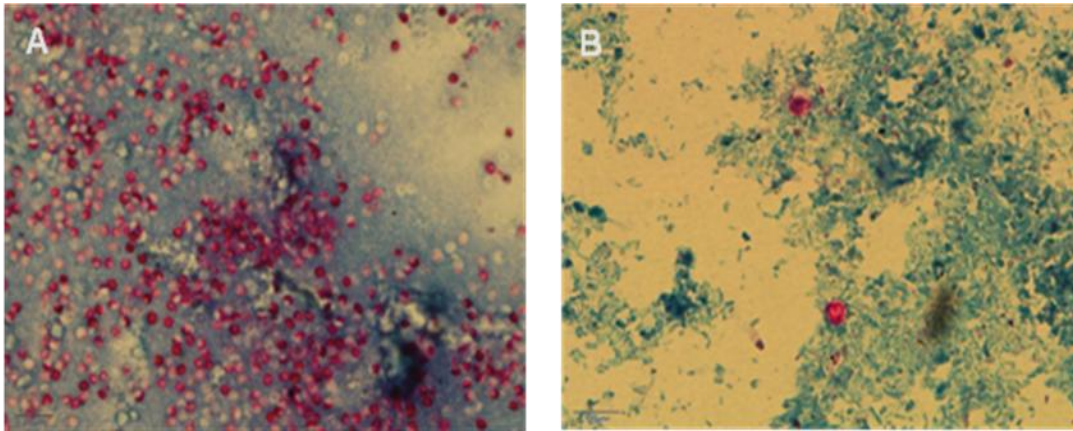
4.1 Avaliação Clínica, Parasitológica e Necroscópica

Todos os animais avaliados apresentaram dois sinais clínicos principais caracterizados por regurgitação pós-prandial e inapetência alimentar. Os sinais clínicos apresentados são de curso crônico, de ocorrência intermitente. Treze animais vieram a óbito: uma Jararaca, duas Cobra arco-íris, um Píton bola, quatro cobras do milho, uma Jiboia e cinco Sucuris. Dezesete animais apresentaram redução progressiva de peso (Tabelas 1 e 2).

Eliminação de oocistos em fezes foi observada em todas as serpentes (Figura 2), em algumas de forma intermitente e a maioria em todos os períodos examinados (Tabelas 1 e 2). Houve ainda variação expressiva na quantidade de oocistos eliminados. Mesmo em períodos em que não houve apresentação de sinais clínicos foi observada eliminação de grande quantidade de oocistos. Da mesma maneira, alguns animais que apresentaram eliminação de grande quantidade de oocistos não estavam entre aqueles com sinais clínicos.

As lesões macroscópicas observadas foram: presença de dermatite vesicular em sete animais (5 sucuris, 1 Jiboia e 1 cobra arco-íris) e edema, espessamento, evidenciação das pregas, hiperemia, exsudato mucoso a mucopurulento em mucosa gástrica (Figura 3). Em todos os animais que vieram a óbito foram observados estágios evolutivos de *C. serpentis* em mucosa gástrica.

Figura 2. Esfregaço de fezes de serpentes naturalmente infectadas por *C. serpentis*. Coloração de Kinyoun. A: escore 4+; B: escore 1+.



4.2 Avaliação Sorológica

Por meio de SDS-PAGE e *Western Blotting* foi possível observar que a IgY anti-gamaglobulinas de serpentes apresentou reatividade contra as gamaglobulinas purificadas a partir do *pool* de soro de serpentes (Figura 4). Foram observados fragmentos de peso molecular semelhantes aos descritos por Hassl (2005), para IgY de serpentes, com a molécula íntegra ou fragmentada, correspondente a aproximadamente 173,4, 57, 51,5, 37,3 e 22,6 kDA. Os outros fragmentos observados sugerem também a presença de outras gamaglobulinas, particularmente a IgM, com a molécula íntegra ou fragmentada.

Os valores das densidade ópticas dos soros que constituíram os *pools* de soros utilizados como controle positivo e negativo do ELISA indireto estão relacionados na tabela 3.

Após padronização do ELISA indireto foi determinado, por meio de análise da curva ROC, que o ponto de corte seria a densidade óptica de 0,056, com sensibilidade de 70% e especificidade de 100% (Tabela 4). Em todos os animais houve grande variação nos títulos de anticorpos anti-*C. serpentis* (Tabela 1, Figura 5). Observou-se que a mesma intermitência observada na eliminação de oocistos também ocorre nos títulos de anticorpos, com alternância de períodos de

negatividade com resposta imune humoral extremamente variável. Em alguns animais observou-se negatividade na sorologia mesmo na presença de sinais clínicos ou de oocistos em amostras fecais.

Neste experimento, considerando um total de 126 amostras fecais examinadas por microscopia e pelo ELISA indireto, foi observado que a microscopia apresentou positividade em 116 amostras fecais (92%) e o ELISA indireto apresentou positividade em 54 amostras de soro (42,9%) (Tabela 5). O cálculo do coeficiente Kappa resultou em concordância regular (0,51) entre os dois testes (PEREIRA, 1995).

Figura 3. Sinais clínicos e lesões macroscópicas em serpentes naturalmente infectadas por *C. serpentis*. A: sucuri – dermatite vesicular (*Blisters*); B: sucuri – mucosa gástrica com hiperemia e presença de exsudato muco-purulento; C: Jiboia – aumento de volume do estômago; D: sucuri – espessamento da mucosa gástrica com evidência das pregas da mucosa e presença de exsudato muco purulento; E: Jiboia - corte transversal do estômago evidenciando espessamento da mucosa e presença de exsudato muco-purulento; F: jiboia - espessamento da mucosa gástrica.



Figura 4 - SDS-PAGE e *Western Blotting* mostrando reação da IgY de galinha contra gamaglobulinas de serpentes fragmentadas. Colunas 1, 3, 5 e 7: marcador de peso molecular (Sigma); coluna 2: eletroforese com 20 μ l de gamaglobulina de serpentes e IgY de galinha inoculada com 500 μ g de gamaglobulina de serpente; coluna 4: eletroforese com 10 μ l de gamaglobulina de serpentes e IgY de galinha inoculada com 500 μ g de gamaglobulina de serpente; coluna 6: eletroforese com 20 μ l de gamaglobulina de serpentes e IgY de galinha inoculada com 100 μ g de gamaglobulina de serpente; coluna 8: eletroforese com 10 μ l de gamaglobulina de serpentes e IgY de galinha inoculada com 500 μ g de gamaglobulina de serpente.

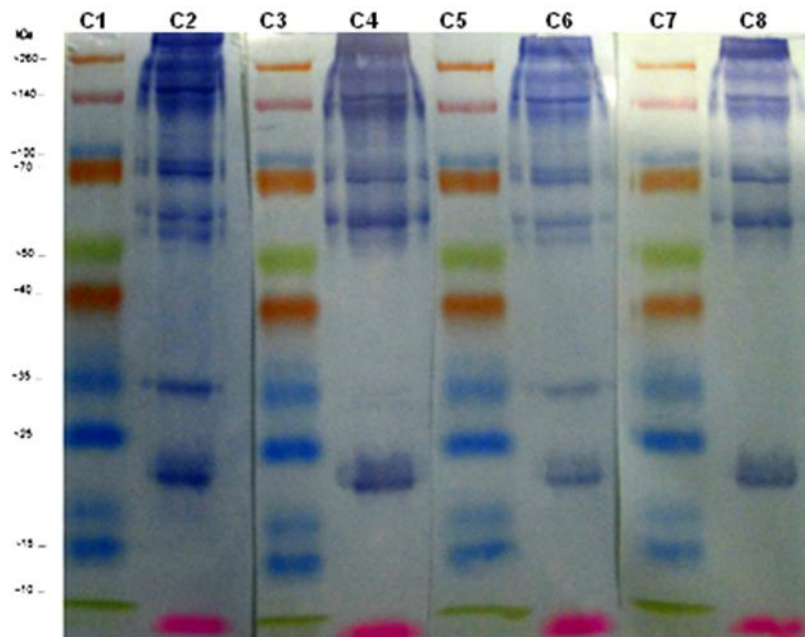


Figura 5 – Resposta sorológica avaliada pelo ELISA indireto em amostras de soro colhido com periodicidade mensal, em serpentes naturalmente infectadas por *Cryptosporidium serpentis*

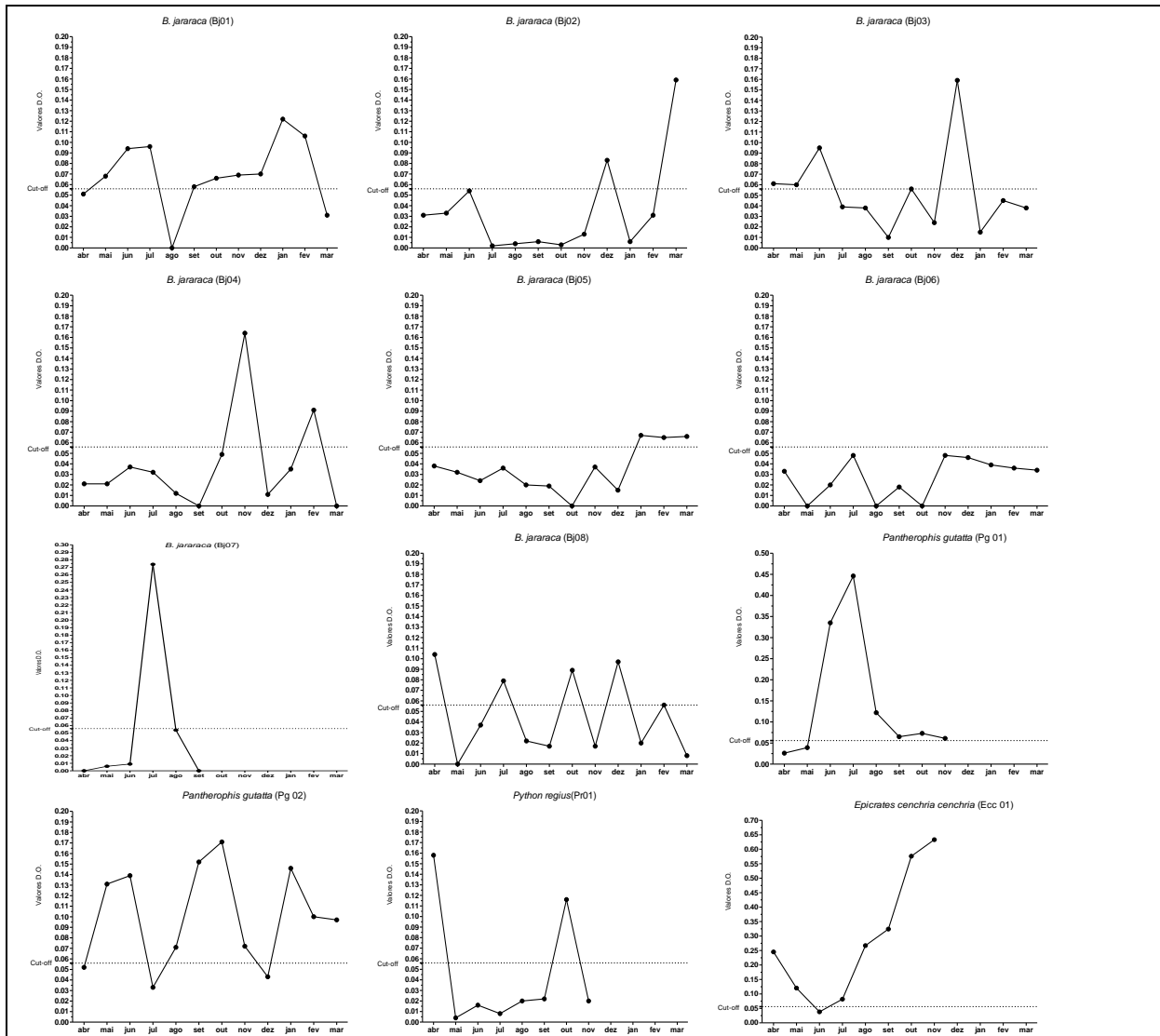


Tabela 1 - Resultados do ELISA indireto, da avaliação semi-quantitativa da eliminação fecal de oocistos, peso corporal e sinais clínicos em serpentes naturalmente infectadas *Cryptosporidium serpentis*.

Espécie de serpente	Identificação da serpente	2011										2012		
		Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	
<i>Bothropoides jararaca</i>	Bj1	DO*	0,051	0,068	0,094	0,096	0,000	0,058	0,066	0,069	0,070	0,122	0,106	0,031
		EO**	4+	3+ ^r	4+	3+ ^r	3+	4+ ^r	4+	3+	2+ ^a	2+ ^a	2+	3+
		Peso ***	815	-	-	-	-	800	-	-	-	-	-	700
	Bj2	DO	0,031	0,033	0,054	0,002	0,004	0,006	0,003	0,013	0,083	0,006	0,031	0,159
		EO	1+	- ^r	- ^a	1+ ^r	1+	2+ ^r	1+	1+	1+ ^r	1+ ^a	- ^r	1+
		Peso	335	-	-	-	-	310	-	-	-	-	-	260
	Bj3	DO	0,061	0,060	0,095	0,039	0,038	0,010	0,056	0,024	0,159	0,015	0,045	0,038
		EO	3+	3+	3+	3+ ^A	3+ ^a	4+	3+	4+ ^a	4+	3+	2+	2+ ^r
		Peso	630	-	-	-	-	680	-	-	-	-	-	680
	Bj4	DO	0,021	0,021	0,037	0,032	0,012	0,000	0,049	0,164	0,011	0,035	0,091	0,000
		EO	3+ ^a	3+ ^r	3+ ^a	3+ ^r	2+	2+ ^r	3+	4+ ^r	4+	3+ ^a	3+	3+
		Peso	520	-	-	-	-	480	-	-	-	-	-	405
Bj5	DO	0,038	0,032	0,024	0,036	0,020	0,019	0,000	0,037	0,015	0,067	0,065	0,066	
	EO	-	1+	-	2+ ^r	1+	-	- ^a	1+	1+	1+	1+	1+ ^a	
	Peso	360	-	-	-	-	380	-	-	-	-	-	385	
Bj6	DO	0,033	0,000	0,020	0,048	0,000	0,018	0,000	0,048	0,046	0,039	0,036	0,034	
	EO	1+	1+	2+ ^a	2+ ^r	-	2+	1+ ^r	-	1+	1+ ^r	2+	1+ ^a	
	Peso	355	-	-	-	-	360	-	-	-	-	-	340	
Bj7	DO	0,000	0,006	0,009	0,274	0,054	0,000†	-	-	-	-	-	-	
	EO	2+	3+ ^r	2+	1+	3+ ^r	2+ ^r	-	-	-	-	-	-	
	Peso	580	-	-	-	-	550	-	-	-	-	-	-	
Bj8	DO	0,104	0,000	0,037	0,079	0,022	0,017	0,089	0,017	0,097	0,020	0,056	0,008	
	EO	2+	2+ ^r	1+	2+	2+	3+ ^a	2+ ^r	1+	2+ ^r	3+	3+	2+ ^a	
	Peso	755	-	-	-	-	605	-	-	-	-	-	580	

Espécie de serpente	Identificação da serpente		Conclusão											
			2011						2012					
			Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
<i>Epicrates c. cenchria</i>	Ecc1	DO	0,245	0,120	0,038	0,082	0,267	0,324	0,576	0,633†	-	-	-	-
		EO	3+	2+ ^r	2+ ^r	3+ ^a	3+	2+	3+ ^a	3+	-	-	-	-
		Peso	820	-	-	-	-	-	-	-	665	-	-	-
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg1	DO	0,026	0,039	0,335	0,446	0,122	0,065	0,073	0,061†	-	-	-	-
		EO	2+ ^r	4+	2+	3+ ^r	3+ ^r	4+	5+ ^a	5+	-	-	-	-
		Peso	430	-	-	-	-	375	-	-	-	-	-	-
	Pg2	DO	0,052	0,131	0,139	0,033	0,071	0,152	0,171	0,072	0,043	0,146	0,100	0,097
		EO	4+	4+ ^r	5+	3+ ^r	2+	4+ ^r	5+	3+ ^a	4+ ^r	2+	2+ ^a	3+
		Peso	690	-	-	-	-	585	-	-	-	-	-	495
<i>Python regius</i>	Pr1	DO	0,158	0,004	0,016	0,008	0,020	0,022	0,116	0,020†	-	-	-	-
		EO	2+	1+	- ^a	1+	1+ ^a	2+ ^r	2+	2+	-	-	-	-
		Peso	2245	-	-	-	-	2390	-	-	-	-	-	-

* Densidade óptica no ELISA indireto. Amostras positivas: densidade óptica acima de 0,056. Nos animais Bj7, Ecc1, Pg1 e Pr1 a colheita de sangue foi realizada por período inferior a 12 meses.

** Número de oocistos por campo em objetiva de 1.000 X: -: negativo; 1+: até 5; 2+: 6 a 15; 3+: 16 a 30; 4+: 31 a 50; 5+ acima de 50.

*** Determinação do peso corporal, em gramas, em períodos selecionados.

† Animal veio a óbito no decorrer do experimento.

Presença de sinais clínicos: ^r Regurgitação pós-prandial; ^a inapetência alimentar.

Tabela 2 - Resultados da avaliação semi-quantitativa da eliminação fecal de oocistos, peso corporal e sinais clínicos em serpentes naturalmente infectadas por *Cryptosporidium serpentis*.

Espécie de Serpente	Identificação da serpente		2009					2010						
			Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
<i>Eunectes murinus</i>	Em 01	SC*	A	-	A	B	C†	-	-	-	-	-	-	-
		EO**	1+	-	-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-
		Peso***	1615	-	-	-	1520	-	-	-	-	-	-	-
	Em 02	SC	A	A	A, C†	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EO	-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Peso	1008	-	990	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Em 03	SC	A	A	-	-	B	-	B	A	C†	-	-	-
		EO	-	1+	1+	-	1+	-	-	1+	-	-	-	-
		Peso	1030	-	-	-	-	-	-	-	920	-	-	-
	Em 04	SC	A	A.	A	C†	-	-	-	-	-	-	-	-
		EO	1+	2+	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
		Peso	1470	-	-	1420	-	-	-	-	-	-	-	-
	Em 05	SC	A	A	C†	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EO	1+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Peso	975	-	950	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantherophis gutatta</i>	Pg 03	SC	B	A	-	-	A	B	B	-	C†	-	-	
		EO	2+	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	-	-	
		Peso	565	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-
	Pg 04	SC	-	B	-	-	A	A	B	-	-	A	-	A, C†
		EO	4+	4+	2+	2+	1+	1+	2+	1+	-	-	1+	-
		Peso	1225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	795
<i>Epicrates c. cenchria</i>	Ecc02	SC	B	-	-	-	B	-	-	-	-†	-	-	
		EO	2+	2+	1+	-	2+	2+	3+	2+	2+	-	-	
		Peso	835	-	-	-	-	-	-	-	845	-	-	-
<i>Boa c. amarali</i>	Bca 01	SC	A	A	B	B, C†	-	-	-	-	-	-	-	
		EO	1+	-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	
		Peso	2425	-	-	2250	-	-	-	-	-	-	-	-

*Sinais clínicos observados. A: Inapetência alimentar; B: Regurgitação pós-prandial; C: perda de peso;

**Eliminação de oocistos: -: não observado; 1+: até 5 oocistos por campo; 2+: 6 a 15 oocistos por campo; 3+: 16 a 30 oocistos por campo; 4+: 31 a 50 oocistos por campo; 5+ acima de 50 oocistos por campo. Observação em aumento 1.000 X.

*** Determinação do peso corporal, em gramas, em períodos selecionados.

† Ocorrência de óbito.

Tabela 3 - Densidade óptica dos soros das serpentes negativas e positivas para *Cryptosporidium* spp., utilizados para controles positivos e negativos no ELISA indireto para detecção de anticorpo para *Cryptosporidium serpentis*

Serpente	Densidade óptica	
	Controle Negativo	Controle Positivo
1	0.023	0.009
2	0.022	0.050
3	0.010	0.467
4	0.056	0.266
5	0.019	0.300
6	0.024	0.268
7	0.016	0.057
8	0.051	0.206
9	0.022	0.079
10	0.016	0.053

Tabela 4 - Resultados da curva ROC para determinação da sensibilidade e da especificidade do ELISA indireto, em função da densidade óptica utilizada para determinação do ponto de corte.

Densidade Óptica	Sensibilidade %	Especificidade %
> 0,0095	90,0	0,0
> 0,0130	90,0	10,0
> 0,0175	90,0	30,0
> 0,0205	90,0	40,0
> 0,0225	90,0	60,0
> 0,0235	90,0	70,0
> 0,0370	90,0	80,0
> 0,0505	80,0	80,0
> 0,0520	80,0	90,0
> 0,0545	70,0	90,0
> 0,0565	70,0	100
> 0,0680	60,0	100
> 0,1425	50,0	100
> 0,2360	40,0	100
> 0,2670	30,0	100
> 0,2840	20,0	100
> 0,3835	10,0	100

Tabela 5 - Resultados da pesquisa de pesquisa de *C. serpentis* por meio de microscopia e ELISA indireto em 126 amostras fecais e de sangue de serpentes naturalmente infectadas por *C. serpentis*.

		Microscopia		Total
		Positivo	Negativo	
Elisa	Positivo	54	0	54
	Negativo	62	10	72
	Total	116	10	126

5 DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados neste experimento, caracterizados por curso crônico, regurgitação pós-prandial e perda de peso progressiva são semelhantes aos já descritos por diversos autores (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995). Nenhum dos animais apresentou aumento de volume na região gástrica, sintoma descrito com frequência em serpentes infectadas por *C. serpentis* (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993).

A ocorrência de óbito em serpentes com criptosporidiose com infecção crônica por *C. serpentis* é comum, assim como a ocorrência de infecções concomitantes (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995). Mesmo que não seja possível afirmar que *C. serpentis* seja a causa primária de mortalidade nas serpentes deste experimento, muito provavelmente a infecção gástrica crônica predispôs os animais à perda de peso progressiva e imunossupressão, resultando em aumento da susceptibilidade a infecções concomitantes por outros agentes etiológicos.

Durante o curso da criptosporidiose em serpentes é comum a intermitência e variação na quantidade de oocistos eliminados em amostras fecais (GRACZYK et al., 1996b; GRACZYK; CRANFIELD, 1998), mesmo em animais sintomáticos, o que dificulta o diagnóstico microscópico. Na tabela 1 é possível observar que a maioria dos animais eliminou oocistos em fezes, em quantidade variável. No entanto, apesar de haver intermitência na eliminação de oocistos fecais, foi possível detectar oocistos em 116 amostras dentre 126 examinadas, na maioria das amostras foi possível a detecção de oocistos, o que demonstra a viabilidade da utilização da microscopia para diagnóstico de criptosporidiose em serpentes, quando há disponibilidade de amostras fecais.

A maioria das bandas observadas na SDS-PAGE e *Western Blotting* é condizente com as bandas observadas por Hassl (2005), referentes a moléculas de IgY de serpentes, íntegras ou fragmentadas. Há ainda outras bandas que provavelmente correspondem a outras imunoglobulinas, como IgM, ou que podem

ser resultantes da formação de aglomerados durante o processo de purificação ou da formação de polímeros, fenômenos observados durante a purificação de IgY de galinhas (YAZAWA et al., 1991; AKITA; NAKAI, 1993; HASSL, 2005).

Para imunização das galinhas foram utilizadas gamaglobulinas totais de serpentes purificadas por precipitação em sulfato de amônio, o que resultou em IgY galinhas contra todas as gamaglobulinas de serpentes. Dessa forma, não é possível determinar qual o tipo de anticorpo foi detectado pelo ELISA indireto. Já foi determinado que serpentes apresentam resposta imune humoral semelhante à de mamíferos, com produção inicial de IgM seguida da produção de IgY (COE et al., 1976). Para testes que tem como o objetivo a detecção da exposição ao parasito, independentemente da evolução da infecção, é importante que o método diagnóstico possa ser utilizado em qualquer fase da enfermidade. Como serpentes geralmente desenvolvem anticorpos após aproximadamente 30 dias pós-inoculação (SALANITRO; MINTON JR., 1973; COE et al., 1976) os animais deste experimento provavelmente se infectaram pelo menos 1 mês antes da primeira colheita de sangue.

Mesmo que haja reatividade cruzada no ELISA indireto, devido à existência antígenos comuns entre diferentes espécies de *Cryptosporidium* (GRACZYK et al., 1996a; ALLISON et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011; BORAD et al., 2012), a probabilidade dos anticorpos detectados pelo ELISA indireto serem produzidos contra outra espécie que não seja *C. serpentis* é pouco provável. Infecção por *Cryptosporidium* em serpentes, com presença de sinais clínicos ou evidência de colonização epitelial pelo parasito é causada, quase que exclusivamente, por *C. serpentis* (XIAO et al., 2004a; RAMIREZ; 2004; GRACZYK, 2008). Há somente uma descrição infecção no epitélio intestinal e evidência de enterite, porém, a espécie de *Cryptosporidium* não foi determinada (BROWER; CRANFIELD, 2001). Oocistos de outras espécies que são ingeridos juntamente com a alimentação, como *C. muris*, *C. parvum* e *C. tyzzeri*, dentre outros, não colonizam o epitélio de serpentes e, muito provavelmente, não estimulam a produção de anticorpos pelas serpentes.

Pelos resultados deste experimento foi observado que, do mesmo modo que o descrito por Graczyk e Cranfield (1997), as serpentes desenvolvem resposta

imunológica humoral contra *C. serpentis*. No entanto, essa resposta é extremamente variável em relação à produção de anticorpos havendo, como consequência, resultados negativos pela sorologia mesmo em animais que apresentam infecção clínica ou subclínica e eliminação de oocistos em fezes.

Graczyk e Cranfield (1997) observaram resposta imune detectada pelo ELISA indireto caracterizada por produção de anticorpos em serpentes naturalmente infectadas. Os autores realizaram somente uma colheita de soro e verificaram que, dentre as 26 amostras examinadas, 19 foram positivas pelo ELISA indireto e 17 foram positivas pela microscopia. Nesse trabalho o ELISA indireto apresentou maior sensibilidade que a microscopia, no entanto, foi realizada somente uma colheita de sangue, o que dificulta uma comparação com os resultados deste experimento. Calle et al. (2001) examinaram oito amostras de soro de anacondas (*Eunectes murinus*) pela técnica desenvolvida por Graczyk e Cranfield (1997) e observou que todas eram negativas.

Como pode ser observado na Figura 2, houve detecção de anticorpos em somente 54 em 126 amostras de soro de animais com comprovadamente positivos para a infecção por *C. serpentis*. Os resultados falso-negativos se devem à flutuação no título de anticorpos e, em alguns casos, à ausência de resposta humoral de alguns animais, em todas as colheitas realizadas, o que inviabiliza a utilização do ELISA indireto como teste definitivo em casos de resultados negativos.

O ponto de corte foi definido com utilização da curva ROC resultou em maior especificidade (100%), em detrimento da sensibilidade (70%). O objetivo é que haja maior probabilidade do teste ser negativo em animais não infectados. No entanto, isso resulta em baixa sensibilidade e maior a probabilidade de resultados falso-negativos.

Dessa maneira, mesmo apresentando baixa sensibilidade devido à flutuação no título de anticorpos, o ELISA indireto poderia ser utilizado para triagem, em decorrência de sua alta especificidade e da maior facilidade para disponibilização de amostras de soro, mas sempre considerando a possibilidade de resultados falso negativos.

A realização de colheitas seriadas de pelo menos três amostras fecais, seguida de exame microscópico, é o método mais recomendado para diagnóstico de criptosporidiose em serpentes (GRACZYK; CRANFIELD, 1998). No entanto, a eliminação de oocistos em alguns animais também é intermitente (Tabela 1) e, dependendo da espécie de serpente, há um intervalo de 30 dias ou mais para que haja disponibilidade de amostras fecais, o que torna o diagnóstico microscópico inviável em algumas situações. Por outro lado, os dados de eliminação de oocistos, observados neste experimento, demonstram que a maioria dos animais eliminaram oocistos em fezes, em quase todos os períodos de colheita (Tabela 1), o que confirma que a microscopia, apesar das dificuldades inerentes à colheita de amostras e à baixa sensibilidade (GRACZYK; CRANFIELD, 1998), é extremamente útil como método de diagnóstico de criptosporidiose em serpentes.

Não é possível determinar as causas da flutuação no nível de anticorpos contra *C. serpentis* observada neste experimento, em virtude da escassez de informações relativas à resposta imunológica contra a criptosporidiose gástrica e, particularmente à criptosporidiose em serpentes. Há relatos de variação sazonal na resposta imune de répteis, seja intata, adaptativa (humoral e celular), como descrito em tartarugas (*Trachemys scripta*) (ZIMMERMAN et al., 2010) e serpentes (*Psammophis schokari*) (EL REIDI et al., 1981). Zapata et al. (1992) também relacionam alterações no sistema imune de anfíbios, peixes e répteis a fatores ambientais, incluindo fotoperíodo e temperatura ambiente e à época do ano e espécie animal. No entanto, as variações no nível de anticorpos observadas neste experimento não seguem nenhum padrão relacionado às estações do ano e os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada.

Um fator que pode estar relacionado à variação no nível de anticorpos é a ocorrência de estresse de cativeiro, o que reconhecidamente predispõe serpentes a enfermidades infecciosas (GREGO, 2000; BARBOSA, 2006). A privação da liberdade, a impossibilidade de termorregulação de forma eficiente e a manipulação, incluindo pesagem e colheita de sangue, interferem no sistema imunológico de répteis devido ao aumento do nível sérico de catecolaminas e glicocorticóides (DAUPHIN-VILLEMANT, 1987; LANCE; LAUREN, 1984; MOORE et al., 1991;

GRASSMAN; HESS, 1992; MONDAL; RAI, 2002; ROY; RAI, 2004). As serpentes utilizadas neste experimento ainda não estavam adaptadas ao cativeiro, fato que, somado à manipulação dos animais, pode ter resultado em estresse e imunossupressão, com queda do nível de anticorpos.

Pela análise dos resultados observados neste experimento, podemos sugerir que para implantação de um programa de controle de criptosporidiose em criatórios de serpentes seja utilizado o ELISA indireto como teste de triagem. Em caso de resultado positivo recomenda-se que o animal não seja introduzido no plantel. Em caso de resultado negativo, recomenda-se que o animal seja transferido para uma área de quarentena onde serão realizadas quatro colheitas seriadas de amostras fecais, de acordo com a disponibilidade, para exame pela técnica de Kinyoun. De forma paralela devem ser feitas quatro colheitas seriadas de amostras de sangue, com periodicidade mensal, para exame pelo ELISA indireto. O resultado negativo em ambos os testes indica que o animal poderá ser introduzido no criatório.

Como existe a possibilidade de detecção de oocistos de outras espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* que não sejam *C. serpentis*, em caso de positividade somente pela microscopia, antes de recomendar o descarte do animal, é necessário realizar a identificação da espécie do parasito por meio de técnicas de biologia molecular.

Desse modo os dois testes utilizados em conjunto seriam extremamente úteis para controle de criptosporidiose em criatórios já infectados e para manutenção de criatórios livres do parasito.

6 CONCLUSÃO

Serpentes infectadas por *C. serpentis* desenvolvem infecção crônica clínica ou subclínica, com apresentação intermitente de sintomas clínicos.

Houve eliminação de oocistos em fezes na maioria dos animais infectados, em alguns casos de forma intermitente e em quantidade variável.

Não há relação entre a quantidade de oocistos eliminados em fezes com a apresentação de sintomas clínicos.

Serpentes desenvolvem resposta imunológica humoral contra *C. serpentis*.

O nível de anticorpos contra *C. serpentis* detectado pelo ELISA indireto é flutuante, resultando em baixa sensibilidade do teste.

Não há relação entre o nível de anticorpos com a apresentação de sintomas clínicos ou com a quantidade de oocistos eliminados em fezes.

O ELISA indireto apresenta alta especificidade e deve ser utilizado para triagem de animais verdadeiramente negativos para *C. serpentis*.

O exame microscópico deve ser utilizado em animais com resultados negativos pelo ELISA indireto.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, H.; WYERS, M.; CABARET, J.; NACIRI, M. Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. **Parasitology Research**, v. 86, p. 179-187, 2000.
- ABREU, V. J. S.; CARDOSO, A. L.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; SINHORINI, I.; DAMY, S. B. Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 191-198, 2003. Supplement.
- ALLISON, G. M.; ROGERS, K. A.; BORAD, A.; AHMED, S.; KARIM, M. M.; KANE, A. V.; HIBBERD, P. L.; NAUMOVA, E. N.; CALDERWOOD, S. B.; RYAN, E. T.; KHAN, W. A.; WARD, H. D. Antibody responses to the immunodominant *Cryptosporidium* gp15 antigen and gp15 polymorphisms in a case-control study of cryptosporidiosis in children in Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicina and Hygiene**, v. 85, p. 97-104, 2011.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1007-1021, 2002.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 133-145, 2004.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Production and purification of Fab'fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). **Journal of Immunological Methods**, v. 162, p. 155, 1993.
- ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Diseases**, v. 52, p. 702-705, 2008.
- ARES-MAZÁS, M. E.; FERNÁNDEZ-DA PONTE, B.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; FREIRE-SANTOS, F.; QUÍLEZ-CINCA, J. CAUSAPÉ-VALENZUELA, A. C.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Oocysts, IgG levels and immunoblot patterns determined for *Cryptosporidium parvum* in bovine examined during a visit to a farm (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 185-193, 1999.

BARBOSA, A. B.; SILVA, H.; ALBUQUERQUE, H. N.; RIBEIRO, I. A. N. Contribuição ao estudo parasitológico de Jiboias, *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758, em cativeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, p. 1-19, 2006.

BARTA, J. R.; THOMPSON, A. R. C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**. v. 22, p. 463-468, 2006.

BEDI, B.; MEAD, J. R. *Cryptosporidium parvum* antigens induce mouse and human dendritic cells to generate Th1 enhancing cytokines. **Parasite Immunology**, 2012. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01382.x.

BORAD, A. J.; ALLISON, G. M.; WANG, D.; AHMED, S.; KARIM, M. M.; KANE, A. V.; MOY, J.; HIBBERD, P. L.; AJJAMPUR, S. S.; KANG, G.; CALDERWOOD, S. B.; RYAN, E. T.; NAUMOVA, E.; KHAN, W. A.; WARD, H. D. Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 214-222, 2012.

BORAD, A.; WARD, H. Human immune responses in cryptosporidiosis. **Future Microbiology**, v. 5, p. 507-519, 2010.

BOROWSKI, H.; CLODE, P. L.; THOMPSON, A. R. C. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 24 p. 509-516, 2008.

BORYSENKO, M. Skin allograft and xenograft rejection in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 170, p. 341-358, 1969.

BROWER, A. I.; CRANFIELD, M. R. *Cryptosporidium sp.* associated enteritis without gastritis in rough green snakes (*Ophedrys aestivus*) and a common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 32, p. 101-105, 2001.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J. D.; MONTALI, R. J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

CALLE, P. P.; RIVAS, J.; MUÑOZ, M.; THORBJARNARSON, J.; HOLMSTROM, M.; KARESH, W. B. Infectious disease serologic survey in free-ranging Venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, p. 320-323, 2001.

CARMEL, B. P.; GROVES, V. Chronic cryptosporidiosis in Australian elapid snakes: control or an outbreak in captive colony. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 293-295, 1993.

CHEN, W.; HARP, J. A.; HARMSSEN, A. G. *Cryptosporidium parvum* infection in gene targeted B cell-deficient mice. **Journal of Parasitology**, v. 89, 391-393, 2003.

CHEN, F.; QIU, H. Identification and characterization of a Chinese isolate of *Cryptosporidium serpentis* from dairy cattle. **Parasitology Research**, 2012. DOI 10.1007/s00436-012-3024-5.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. **Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man**. 2. ed. Paris: OIE, 1988. 122p.

COE, J. E.; LEONG, D.; PORTIS, J. L. THOMAS, L. A. Immune response in the garter snake (*Thamnophis ordinoides*), **Immunology**, v. 31, p. 417-424, 1976.

CRABB, J. H. Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, v. 40, p. 121-149, 1998.

CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K. Experimental Infection of Elaphid Snakes with *Cryptosporidium serpentis* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) **Parasitology**, v. 80, p. 823-826, 1994.

CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K. Cryptosporidiosis. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**, W. B. Saunders Elsevier, 2006, 756-762.

CURRENT, W. L. *Cryptosporidium* Species. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild medicine current Therapy**. 4 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, PA, 1999, p. 121-131.

CURRENT, W. L.; SNYDER, D. B. Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. **Poultry Science**, v. 67, p. 720-729, 1988.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 289-296, 1986.

DAUPHIN-VILLEMANT, X. F. Nycthemeral variations of plasma corticosteroids in captive female *Lacerta vivipara* Jacquin: influence of stress and reproductive state. **General and Comparative Endocrinology**, v. 67, p. 292-302, 1987.

DILLEHAY, D. L.; BOOSINGER, T. R.; MacKENZIE, S. Gastric cryptosporidiosis in a chameleon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 1139-1140, 1986.

EL RIDI, R., BADIR, E. N.; EL ROUBY, S. Effect of seasonal variations on the immune system of the snake, *Psammophis schokari*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 216, p. 357-365, 1981.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N. D.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 675-682, 2012.

EVANS, E. E. Antibody response in Amphibia and Reptilia. **Federation Proceedings**, v. 22, p. 1132-1137, 1963.

EVANS, E. E.; COWLES, R. B. Effect of temperature on antibody synthesis in the reptile, *Dipsosaurus dorsalis*. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 101, p. 482-483, 1959.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, 90-97, 2010.

FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; CRANDFIELD, M. R. Multiple heterogeneous isolates of *Cryptosporidium serpentis* from captive snakes are not transmissible to neonatal BALB/c mice (*Mus musculus*). **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 482-484, 1995.

FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; SANTIN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 23-32, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, 191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 624-629, 2005.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAL, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1415-1422, 2001.

GAMBÓN-DEZA, F.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C.; MIRETE-BACHILLER, S.; MAGADÁN-MOMPÓ, S. Snakes antibodies. **Developmental and Comparative Immunology**, 2012. doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.001.

GODSHALK, C. P.; MacCOY, D. M.; PATTERSON, J. S.; McKIERNAN, B. C. Gastric hypertrophy associated with cryptosporidiosis in a snake. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 1126-1128, 1986.

GRACZYK, T. K. Fish, Amphibians, and Reptiles. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium and Cryptosporidiosis***. Boca Raton, CRC Press, 2008, p. 387-394, 560 p.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. Detection of *Cryptosporidium*-specific serum

immunoglobulins in captive snakes by a polyclonal antibody in the indirect ELISA. **Veterinary Research**, v. 28, p. 131-142, 1997.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocysts isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. **Veterinary Research**, v. 29, p. 187-195, 1998.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, p. 274-279, 1996a.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; BOSTWICK, E. F. Hyperimmune bovine colostrum treatment of moribund leopard geckos (*Eublepharis macularius*) infected with *Cryptosporidium* sp.. **Veterinary Research**, v. 30, p. 377-382, 1999.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; HELMER, P.; FAYER, R. BOSTWICK, E. F. Therapeutic efficacy of hyperimmune bovine colostrum treatment against clinical and subclinical *Cryptosporidium serpentis* infections in captive snakes. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 123-132, 1998.

GRACZYK, T. K.; OWENS, R.; CRANFIELD, M. R. Diagnosis of subclinical cryptosporidiosis in captive snakes based on stomach lavage and cloacal sampling. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 143-151, 1996b.

GRASSMAN, M.; HESS, D. L. Sex differences in adrenal function in the lizard *Cnemidophorus sexlineatus*: II. responses to acute stress in the laboratory. **Journal of Experimental Zoology**, v. 264, p. 183-188, 1992.

GREGO, K. F., **Patologia comparada das principais infecções parasitárias acometendo serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (WIED, 1824)**. 2000. 155 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HASSL, A. Snake egg immunoglobulins: biochemical characteristics and adjusted isolation procedure. **Journal of Immunological Methods**, v. 297, p. 253-257, 2005.

HEBERT, G. A., PELHAM, P. L., PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulfate for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 26-36, 1973.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 285-307, 1979.

JALOVECKÁ, M.; SAK, B.; KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; KUČEROVÁ, Z.; SALÁT, J. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1159-1166, 2010.

- JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KRÍŽEK, J.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, p. 81-94, 2008.
- KARASAWA, A. S. M.; da SILVA, R. J.; MASCARINI, L. M.; BARRELLA, T. H.; LOPES, C. A. M. Occurrence of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in *Crotalus durisus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 779-781, 2002.
- KIMBELL, L. M.; MILLER, D. L.; CHAVEZ, W.; ALTMAN, N. Molecular Analysis of the 18 S rRNA Gene of *Cryptosporidium serpentis* in a Wild-Caught Corn Snake (*Elaphe guttata guttata*) and a Five-Species Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Assay That Can Additionally Discern *C. parvum* from *C. wrairi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5345-5349, 1999.
- KOPPENHEFFER, T. L. Serum complement systems of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, p. 279-286, 1987.
- KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v. 40, p. 93-100, 1998.
- KVÁC, M.; KODÁKOVÁ, A.; SAK, B.; D. KVETONOVÁ, D.; JALOVECKÁ, M.; ROST, M.; SALÁT, J. Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 210-216, 2011.
- KVÁC, M.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; DITRICH, D.; HOFMANNOVÁ, L.; MODRÝ, D.; VÍTOVEC, D.; XIAO, L. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 363-367, 2008.
- KOPPENHEFFER, T. L. Serum complement systems of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, p. 279-286, 1987.
- LANCE, V.A.; LAUREN, D. Circadian variation in plasma corticosterone in the American alligator, *Alligator mississippiensis*, and the effects of ACTH injection. **General and Comparative Endocrinology**, v. 54, p. 1-7, 1984.
- LAPPIN, M. R.; BROWN-HAHN, B.; COOPER, C. M.; SPILKER, M.; THRALL, M.; HILL, S.; CHENEY, J.; TATON-ALLEN, G.; UNGAR, B. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cryptosporidium* spp. IgG in the serum of cats. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 957-960, 1997.
- LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, p. 1-16, 2012.
- LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 830-834, 1980.

- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; OWENS, D. S.; MORGAN, U. M.; MEAD, J. R.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.
- LORENZO-LORENZO, M. J.; ARES-MÁZAS, E.; MATURANA, I. V. M. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult Cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 47, p. 9-15, 1993.
- McDONALD, V.; ROBINSON, H. A.; KELLY, J. P.; BANCROFT, G. J. Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2556-2562, 1996.
- MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 1-26, 1988.
- MONDAL, S.; RAI, U. Dose and time-related in vitro effects of glucocorticoid on phagocytosis and nitrite release by splenic macrophages of wall lizard *Hemidactylus flaviviridis*. **Comparative and Biochemical Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, p. 461-470, 2002.
- MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 1-26, 1988.
- MOORE, M. C.; THOMPSON, C. W.; MARLER, C. A. Reciprocal changes in corticosterone and testosterone levels following acute and chronic handling stress in the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 81, p. 217-226, 1991.
- MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; LAL, A. A.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Parasitology**, v. 85, 525-530, 1999.
- MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.
- O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.
- ORIGGI, F. C. Reptile Immunology. In: JACOBSON, E. R. **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: color atlas and text**. Boca Raton, CRC Press, 2007, p.131-166,736 p.

PANTENBURG, B.; CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; DANN, S. M.; CONNELLY, R. L.; LEWIS, D. E.; WARD, H. D.; WHITE JR., A. C. Human CD8 + T cells clear *Cryptosporidium parvum* from infected intestinal epithelial cells. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 600-607, 2010.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia - Klinická Mikrobiologie**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi**, v. 51, p. 103-108, 2001.

PAVLÁSEK, I.; LÁVICKOVÁ, M.; HORÁK, P.; KRÁL, J.; KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v. 22, p. 99-108, 1995.

PAVLÁSEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 434-437, 2008.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

PETRY, F.; JAKOBI, V.; TESSEMA, T. S. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 304-309, 2010.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 187-199, 2009.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p. 1-13, 2004.

RIGSS, M. W. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1067-1080, 2002.

ROBIN, G.; FRASER, D.; ORR, N.; SELA, T.; SLEPON, R.; AMBAR, R.; DAGAN, R.; LE BLANCQ, S.; DECKELBAUM, R. J.; COHEN, D. *Cryptosporidium* infection in Bedouin infants assessed by prospective evaluation of anticryptosporidial antibodies and stool examination. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, 194-201, 2001.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F.; BARTLEY, P. M.; HUNTER, P. R.; NATH, M.; INNES, E. A.; CHALMERS, R. M. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1539-1548, 2010.

ROY, B.; RAI, U. Dual mode of catecholamine action on splenic macrophage phagocytosis in wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, p. 180-191, 2004.

RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 4, p. 769-773, 2004.

RYAN, U. M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 22-26, 2008.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003.

SALANITRO, S. K.; MINTON, JR., S. A. Immune response of snakes. **Copeia**, v. 28, p. 504-515, 1973.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: **Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes Ofídicos**. 2008. Disponível em : http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf. Acesso em: 20 jul. 2012.

SEVÁ, A. P.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; SOUZA, S. O.; CRUZ, J. B.; LISBOA, C. B.; CORREA, S. H. R.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular diagnosis of *Cryptosporidium serpentis* in captive snakes in São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p. 326-329, 2011.

SILVA, D. C.; HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; TEIXEIRA, W. F. P.; PERRI, S. H.; MEIRELES, M. V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v. 107, p. 271-277, 2010.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p. 262-266, 1955.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Brazilian Reptiles – List of Species**. 2012. Disponível em: http://www.sbherpetologia.org.br/?page_id=629. Acesso em: 20 de jul. 2012.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, p. 261-279, 2000.

TEIXEIRA, C. A.; BARRETO, M. L.; MELO, C.; SILVA, L. R.; MORAES, L. R. S.; ALCÂNTARA-NEVES. A serological study of *Cryptosporidium* transmission in a periurban area of a Brazilian Northeastern city. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, p. 1096-1104, 2007.

TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; NUNES, C. M.; MEIRELES, M. V. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 269-273, 2011.

TILLEY, M.; UPTON, S. J.; FREED, P. S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, p. 463-467, 1990.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archive fur Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.

UPTON, S. J.; McALLISTER, C. T.; FREED, P. S.; BARNARD, S. M. *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, p. 20-30, 1989.

VETTERLING, J. M.; JERVIS, H. R.; MERRILL, T. G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 243-247, 1971.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; FAYER, L., RYAN, R.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17,

p. 72-97, 2004b.

XIAO, L.; RYAN, U. M.; GRACZYK, T. K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN I. M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M. J.; KOUDELA, B.; MODRY, D.; LAL, A. A. Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 891-899, 2004a.

XIAO, L.; SULAIMAN, I. M.; RYAN, U. M.; ZHOU, L.; ATWILL, E. R.; TISCHLER, M. L.; ZHANG, XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

YAZAWA, S.; HOSOMI, O.; TAKEYA, A. Isolation and characterization of anti-H antibody from egg yolk of immunized hens. **Immunological Investigations**, v. 20, p. 569, 1991.

ZAPATA, A. G.; VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. **Immunology Today**, v. 13, p.142–147, 1992.

ZIMMERMAN, L. M.; PAITZ, R. T.; VOGEL, L. A.; BOWDEN, R. M. Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 1477-1483, 2010.

Apêndice A - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:50, 1:100, 1:200), das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:100, 1:200, 1:500), e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:1000) em placa de poliestireno padrão.

Teste de diluições – Soro de serpentes / IgY Anti-serpentes / IgG anti-IgY de galinhas (Placa 380µl)						
Diluição dos soros serpentes		Diluição do Anti-IgY de serpentes				Anti IgY de galinha 1:1000
		1:100	1:200	1:500		
Controle positivo	1:50	1.695	0.886	0.463		
	1:100	1.638	0.716	0.378		
	1:200	1.563	0.716	0.366		
Controle negativo	1:50	1.248	0.343	0.104		
	1:100	1.089	0.217	0.054		
	1:200	0.275	0.260	0.128		

Apêndice B - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:100, 1:200), das Igy de galinha anti-IgY de serpente (1:1000, 1:2000e 1:3000) e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada à peroxidase (1:5000), em placa de pliestireno padrão.

Teste diluições – Soro serpentes / Anti serpentes / Anti-galinhas (Placa 380µl)					
Diluição dos soros de serpentes		Anti-IgY de serpentes			Anti IgY de galinha 1:5000
		1:1000	1:2000	1:3000	
Controle positivo	1:100	0.723	0.514	0.419	
	1:200	0.650	0.469	0.361	
Controle negativo	1:100	0.255	0.162	0.099	
	1:200	0.186	0.109	0.059	

Apêndice C - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:200, 1:400), das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000, 1:4000), e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), em placa de poliestireno padrão.

Teste diluições – Soro serpentes / Anti serpentes / Anti-galinhas (Placa 380µl)				
Diluição dos soros de serpentes		Anti IgY de serpentes		Anti IgY de galinha 1:5000
		1:3000	1:4000	
Controle positivo	1:200	0.335	0.280	
	1:400	0.252	0.206	
Controle negativo	1:200	0.201	0.148	
	1:400	0.172	0.091	

Apêndice D - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente e de uma amostra positiva e uma amostra negativa (1:200, 1:400); das IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000); e da IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), em placa de poliestireno padrão.

Teste Diluição dos Soros (Placa 380µl)			Anti IgY de galinha 1:5000
Diluição dos soros de serpentes		Anti Igy serpentes 1:3000	
Controle positivo	1:200	0.368	
	1:400	0.310	
Controle negativo	1:200	0.090	
	1:400	0.065	
Amostra positiva	1:200	0.496	
	1:400	0.390	
Amostra negativa	1:200	0.100	
	1:400	0.054	

Apêndice E - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno meia área e *colt* com 25µl.

Teste Bloqueios (SFB / BSA) Placa (190µl)			
Soro serpentes 1:400		Anti Igy serpentes 1:3000	Anti IgY de galinha 1:5000
Controle positivo	SFB	0.166	
	BSA	0.247	
Controle negativo	SFB	0.041	
	BSA	0.071	

Apêndice F - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno convencional e *colt* com 50 µl.

Teste Bloqueios (SFB / BSA) Placa (380µl)			
Soro serpente 1:400		Anti Igy serpentes 1:3000	Anti IgY de galinha 1:5000
Controle positivo	SFB	0.153	
	BSA	0.209	
Controle negativo	SFB	0.037	
	BSA	0.092	

Apêndice G - Valores das médias das DO dos controles negativo e positivo dos soros de serpente (1:400), com IgY de galinha anti- IgY de serpente (1:3000), e IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase (1:5000), utilizando dois diferentes bloqueios: Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina (BSA) em placa de poliestireno meia área e *colt* com 50µl.

Teste Bloqueios (SFB / BSA) Placa (190µl)			Anti IgY de galinha 1:5000
Soro serpentes 1:400		Anti Igy serpentes 1:3000	
Controle positivo	SFB	0,223	
	BSA	0.288	
Controle negativo	SFB	0.038	
	BSA	0.065	