CRISTIANE KIYOMI MIYAJI KOLESNIKOVAS

Infecção Experimental por Paramyxovírus em Serpentes Boa constrictor (LINNAEUS, 1758). Estudo Anátomo-Patológico, Imunoistoquímico, Microbiológico, Hematológico e Sorológico.

São Paulo
2003

CRISTIANE KIYOMI MIYAJI KOLESNIKOVAS

INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR PARAMYXOVÍRUS EM SERPENTES Boa constrictor (LINNAEUS, 1758). ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO, IMUNOISTOQUÍMICO, MICROBIOLÓGICO, HEMATOLÓGICO E SOROLÓGICO.

Tese apresentada ao programa pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. José Luiz Catão Dias

São Paulo
2003

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

Foto: *Boa constrictor*
Autor: Sávio Stefanini Sant'Anna

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1287
FMVZ

Kolesnikovas, Cristiane Kiyomi Miyaji
Infecção experimental por paramyxovírus em serpentes *Boa constrictor* (Linnaeus, 1758). Estudo anátomo-patológico, imunoistoquímico, microbiológico, hematológico e sorológico / Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas. -- São Paulo : C. K. M. Kolesnikovas , 2003.
115 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. 2003.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Paramyxovírus. 2. *Boa constrictor*. 3. Infecção experimental animal. 4. Patogenia animal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Inoculação experimental de Paramixovírus em serpentes *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758). Estudo anátomo-patológico, morfométrico e microbiológico.", Protocolo nº 33/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 05/06/2002.

(We certify that the Research "Experimental innoculation of ophidian Paramyxovirus in *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758). Anatomo-pathological, morphometrical and microbiological study" protocol number 33/2002, under the responsability of Prof.Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 06/05/2002 meeting.

São Paulo, 05 de junho de 2002

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone/Fax: (011) 3032-2224 / 3091-7671 / 3091-7676

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **074/2002**, sobre o projeto intitulado **"Inoculação experimental de paramixovírus em serpentes *Boa constrictor*. Estudo anátomo-patológico, microbiológico e morfométrico"**, sob a responsabilidade de **Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **25/03/2002.**

(We certify that the protocol nº **074/2002** about " ***Experimental innoculation of paramyxovirus in Boa constrictor. Anatomo-pathological, microbiological and morphometrical study"*** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **25/03/2002** meeting.)

São Paulo, 25 de março de 2002.

Profa. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: KOLESNIKOVAS, Cristiane Kiyomi Miyaji
Título: Inoculação Experimental por OPMV em Serpentes *Boa constrictor*. Estudo anátomo-patológico, imunoistoquímico, microbiológico, hematológico e sorológico.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição_____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____Instituição_____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____Instituição_____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____Instituição_____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____Instituição_____

Julgamento_____Assinatura_____

A todas as pessoas que dedicam
suas vidas à compreensão do maravilhoso mundo dos animais selvagens.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias pela confiança, dedicação e, acima de tudo, pela amizade durante todos os anos de trabalho conjunto.

À Profa. Dr. Dolores Úrsula Mehnert, do departamento de Virologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela coorientação, transmissão dos conhecimentos em virologia e por me acolher em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Elliott R. Jacobson, da School of Veterinary Medicine- University of Florida, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e forneceu as amostras de células de coração de viperídeo e de paramixovírus.

À Luciana Carla Rameh Albuquerque Zanotti, pós-graduanda do Departamento de Patologia da FMVZ- USP, pela inestimável colaboração no experimento, e acima de tudo, pela amizade.

À Telma Alves Monezi, do Departamento de Virologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, que, mesmo nos momentos mais difíceis, estava disposta a ensinar e ajudar na execução e compreensão dos ensaios virológicos.

A Marco Aurélio Gattamorta, pelo companheirismo, amizade e prontidão em ajudar nas mais diversas ocasiões.

À Prof. Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli, responsável pelo Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ- USP e Ana Paula Garate, pelo auxílio prestado na execução e interpretação dos ensaios imunoistoquímicos.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira, do Departamento de Prevenção e Saúde Animal da FMVZ- USP, pela execução dos testes estatísticos.

Ao Prof. José Luiz Merusse e Cláudia Mori responsáveis pelo Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ- USP, e todos seus funcionários, pelo fornecimento dos camundongos utilizados para alimentação das serpentes.

Às meninas do Laboratório de Virologia, Ariana, Fabiana, Valéria, Ximena, Patrícia e Mônica, pela amizade, ajuda e companheirismo nos momentos difíceis.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia da FMVZ- USP, Cláudio Arroio, Luciano anta Bugalho e Margueti Isaura Soares da Silva pela execução de procedimentos histopatológicos.

À Shirlei Meire da Silva, sempre disposta a ajudar, e principalmente pelo constante bom humor.

Aos eternos amigos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Wilson Fernandes, Kathleen F. Grego, Sávio Stefanini Sant`Anna e Alexandre Zanotti sempre dispostos a ajudar.

À Furna Centrais Elétricas pela doação das serpentes utilizadas no experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram no sucesso deste trabalho.

Aos meus pais pelo constante esforço e amor dedicados neste longo caminho.

Aos meus irmãos, Claudio e Eliane, pelo amor, amizade, incentivo e exemplo.

Ao Celso, Rafael, Leonardo e Aninha, por tudo...

RESUMO

KOLESNIKOVAS, C. K. M. **Infecção experimental por Paramyxovirus em serpentes *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758).** Estudo anátomo-patológico, imunoistoquímico, microbiológico, hematológico e sorológico. [Experimental infection with Paramyxovirus in *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758) snakes. A pathological, imunohistochemical, microbiological, hematological and serological study]. 2003. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Apesar dos múltiplos avanços na compreensão gênica e taxonômica do Paramixovírus de serpentes (OPMV), apenas a patogenia pulmonar é razoavelmente conhecida nos viperídeos. O objetivo do presente estudo foi investigar, através de exames anátomopatológicos, imunoistoquímicos microbiológicos, hematológicos e sorológicos, a patogenia do Paramixovírus em jibóias (*Boa constrictor*). Dez animais foram inoculados por via endotraqueal com uma suspensão viral de OPMV. Os animais foram submetidos à eutanásia aos pares, aos 3, 7, 14, 21 e 60 dias após a infecção. Dois indivíduos foram utilizados como controle negativo. Lavados traqueais e amostras de sangue foram colhidas antes da inoculação, às necrópsias e nos animais dos grupos remanescentes. A presença de anticorpos anti-OPMV foi detectada aos 2 mPI através da técnica de inibição de hemaglutinação. A análise estatística dos resultados hematológicos demonstrou não haver diferença significativa entre os dados obtidos nos diversos tempos. À necrópsia amostras de órgãos foram colhidos para análises histopatológica, imunoistoquímica, bacteriológica e virológica (isolamento e RT-PCR). Macroscopicamente, apenas um animal (7dPI) apresentou pneumonia piogranulomatosa. As principais lesões microscópicas pulmonares observadas foram infiltração granulocítica, associada à formação de ninhos de células mononucleares, formação de sincícios; presença de hiperplasia e hipertrofia epiteliais em todos os tempos experimentais. Em pâncreas pôde ser diagnosticada formação de sincícios e presença de infiltrado mononuclear; em baço foi observada histiocitose, eventualmente

associada à infiltração granulocítica perifolicular; gliose de padrão difuso ou focal. Os ensaios imunoistoquímicos e isolamento viral, com confirmação da presença do OPMV por RT-PCR, foram positivos em pulmão, fígado, baço e pâncreas dos 3 aos 21 dPI, sendo negativos aos 60 pPI. O diagnóstico molecular de lavado traqueal após passagem em cultura celular foram positivos aos 3, 7, 14 e 21d PI.. A ausência de sinais clínicos associada à detecção de lesões, isolamento e diagnóstico positivo por RT- PCR sugerem que as jibóias podem representar uma importante fonte assintomática de infecção até os 21 d PI.

Palavras-chave: Paramyxovirus. *Boa constrictor*. Infecção experimental animal. Patogenia animal.

ABSTRACT

KOLESNIKOVAS, C. K. M. **Experimental infection with Paramyxovirus in *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758) snakes.** A pathological, imunohistochemical, microbiological, hematological and serological study. [Infecção experimental por Paramyxovirus em serpentes *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758). Estudo anátomo-patológico, imunoistoquímico, microbiológico, hematológico e sorológico]. 2003. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Despite multiple advances in the genetic and taxonomic understanding of ophidian paramyxovirus (OPMV), only pulmonary pathogenesis is reasonably known in viperids. The objective of the present study was to investigate the pathogenesis of paramyxovirus infection in Boidae by pathological, imunohistochemical, microbiological, hematological and serological studies. Ten *Boa constrictor* snakes were infected by endotracheal inoculation with a viral solution. The animals were euthanatized in pairs at 3, 7, 14 and 21 days and at 2 months after infection. Two uninfected boas were sacrificed before and after the experimental study and were used as negative controls. Tracheal washes and blood were collected from all snakes. Seroconversion was detected at 2 mPI by hemagglutination inhibition assays. Estatistical analysis of the hematological data by Friedman Test revealed no diferences between them. At necropsy, samples of all major organs were obtained for histopathological, immunohistochemical, bacteriological and virological (viral isolation and RT-PCR). At necropsy, only one snake (7 days PI) had gross changes in the lung. The most consistent microscopic findings in the lungs were granulocyte infiltration, associated with the formation of mononuclear cell nests, formation of syncytia, and presence of epithelial hyperplasia and hypertrophy. Formation of syncytia was observed in pancreas, a mononuclear infiltrate was also observed; splenic histiocytosis with perifollicular

granulocyte infiltration; diffuse and focal pattern of gliosis was detected in the CNS of most of the animals. Immunohistochemical examination and viral isolation, with confirmation of the virus' presence by RT-PCR, were positive for lung, liver, spleen and pancreas from 3 to 21 dPI and negative at 2 m PI. Virus isolation from tracheal washes, with confirmation by molecular diagnosis were positive at times 3, 7, 14 and 21 dPI. At 2 mPI all results were negative. The immunohistochemical results associated with virus isolation and RT-PCR suggest that the virus was probably eliminated from the organism at 2 mPI. The absence of clinical symptoms associated with the detection of lesions and with isolation and a positive diagnosis by PCR in the present study suggest that *Boa constrictors* may represent an important source of infection for other reptiles.

Key words: Paramyxovirus. *Boa constrictor*. Experimental infection. Pathogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de corte longitudinal de pulmão de animal controle nº 12. Notar o padrão macroscópico normal do órgão.....75

Figura 2 - Fotografia de corte longitudinal de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verifique a presença de grande quantidade conteúdo seroso espumoso. Animal no 07, grupo D, 14 dPI.....75

Figura 3 - Fotografia de corte longitudinal de fígado de animal controle. Observe o discreto aumento de volume do órgão, caracterizado pelo arredondamento de bordos. Animal no 12.....75

Figura 4 - Corte longitudinal de fígado de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar coloração amarelada e arredondamento de bordos. Animal no 06, grupo D, 14 dPI 75

Figura 5 - Fotomicrografia de pulmão de animal controle. Notar a regularidade da arquitetura pulmonar. Animal no 01. HE. 400X.....77

Figura 6 - Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Observar a presença de congestão e hiperplasia epitelial. Animal no 02, grupo B, 3 dPI. HE. 200X. 77

Figura 7 - Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Hiperplasia e hipertrofia epitelial associada a infiltrado granulocítico. Animal no 05, grupo C, 7 dPI. HE. 400X 77

Figura 8 - Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Notar intensa hiperplasia e hipertrofia epitelial. Animal no 06, grupo C, 14 dPI.HE. 200X 77

Figura 9 - Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a persistência de hiperplasia e hipertrofia epitelial, com presença de granulócitos. Animal no 11, grupo F, 2 mPI. HE. 400X 79

Figura 10 - Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Presença de ninhos de células mononucleares. Animal no 06, grupo C, 14 dPI. HE. 200X 79

Figura 11 - Fotomicrografia de fígado de animal controle. Verifique a presença de degeneração gordurosa goticular. Animal no 01,grupo A. HE. 400X.....79

Figura 12 - Fotomicrografia de fígado de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Observar a presença de aglomerados celulares. Animal no 03, grupo A, 3 dPI.. HE. 400X 79

Figura 13 - Fotomicrografia de pâncreas de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a presença de aglomerados celulares. Animal no 07, grupo D 14 dPI. HE. 400X 81

Figura 14 - Fotomicrografia de SNC de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verifique a presença de gliose difusa. Animal no 05, grupo C, 7 dPI. HE. 100X 81

Figura 15 - Fotomicrografia de baço de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar o padrão perifolicular de infiltração granulocítica. Animal no 09, grupo E, 21 dPI. HE. 100X.....81

Figura 16 - Fotomicrografia de pâncreas de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a intensa marcação imunoistoquímica. Animal no 07. grupo D, 14 dPI. ABC. 400X 83

Figura 17 - Fotomicrografia de baço de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Observe a intensa marcação imunoistoquímica. Animal no 06, grupo D, 14 dPI. ABC. 400X 83

Figura 18 - Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a marcação multifocal. Animal no 06, grupo D, 14 dPI. ABC. 400X.....83

Figura 19 - Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verifique a intensa marcação epitelial linear. Animal no 09, grupo E, 21 dPI. ABC.100X.....83

Figura 20 - Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Pneumonia piogranulomatosa severa. Animal no 04, grupo C, 07 dPI HE. 200X. 85

Figura 21 - Fotomicrografia de monocamadas de VHC. HE. 5X 85

Figura 22 - Fotomicrografia de cultura celular de VHC inoculada com fluído de lavado traqueal colhido aos 7dPI. Notar formação de sincício. Animal no 5. HE. 10X 85

Figura 23 - Resultados de RT- PCR realizado à partir lavado traqueal após passagem em cultura celular. Linhas 1,2, 3 e 4: animais 8, 9, 10 e 11 aos 21 d PI. Linhas 5, 6, 7: animais 10, 11 e 12 aos 2 m PI. (+) controle positivo 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências gênicas para síntese de “primers” para técnica de RT- PCR (AHNE et al., 1999 38

Tabela 2 - Distribuição dos animais utilizados no experimento em relação ao sexo, comprimento e peso 46

Tabela 3 - Distribuição de valores médios de exames hematológicos e respectivos erros padrão da média obtidos em relação ao dia de colheita após a inoculação do agente viral. São Paulo, 2001-2 60

Tabela 4 - Distribuição das principais lesões microscópicas observadas, em função dos órgãos acometidos. São Paulo, 2001-2 68

Tabela 5 - Distribuição de resultados de isolamento viral e RT-PCR a partir de fluido de cultura celular de lavados traqueais de *Boa constrictor* experimentalmente inoculadas com OPMV. São Paulo, 2001-2 72

Tabela 6 - Distribuição dos resultados de isolamento viral em cultura celular e de RT-PCR a partir de fluido de cultura celular em relação ao animal. São Paulo, 2001-2 73

LISTA DE NOMES CIENTÍFICO E POPULARES

Nome científico	**Nome popular**
Azmiops feiyi	Víbora chinesa
Boa constrictor	Jibóia
Bothrops alternatus	Urutu
Bothrops jararaca	Jararaca
Bothrops moojeni	Caiçaca
Crotalus adamanteus	“Aruba Island Rattlesnake”
Crotalus durissus	Cascavel
Crotalus unicolor	“Eastern Diamondback Rattlesnake”
Lichanaura trivirgata	“Rosy boa”
Morelia boeleni	Píton de Boeleni
Phyton regius	Ball Píton
Phyton reticulatus	Píton reticulatus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA 21

2.1 *Boa constrictor*- Aspectos biológicos 21

2.2 Enfermidade em répteis 22

2.3 A família Paramyxoviridae 25

2.3.1 Classificação 25

2.3.2 Estrutura 26

2.3.3 Patogênese das infecções virais 27

2.3.4 Susceptibilidade do hospedeiro 29

2.3.5 Infecções virais persitentes 30

2.4 O Paramyxovirus de serpentes (OPMV) 31

2.4.1 Histórico 31

2.4.2 Caracterização e classificação 32

2.4.3 Sinais clínicos e estudos anátomo-patológicos 33

2.4.4 Métodos diagnósticos 35

2.4.4.1 Análise ultraestrutural 35

2.4.4.2 Isolamento viral 36

2.2.4.3 Hemaglutinação (H.A.) e inibição da hemaglutinação (H.I.) 36

2.4.4.4 Imunoistoquímica 37

2.2.4.5 Diagnóstico molecular 37

2.5 Estudos experimentais 38

2.6 OPMV em boídeos 40

2.7 Hematologia em serpentes e resposta inflamatória .....

2.8 Resposta imune .....

3 OBJETIVOS .....

4 MATERIAL E MÉTODO .....

4.1 Animais .....

4.2 Grupos experimentais .....

4.3 Inóculo e inoculação 4

4.4 Colheita de sangue e lavados traqueais 4

4.5 Hemograma 4

4.5.1 Contagem diferencial de células 4

4.5.2 Hemograma 5

4.6 Determinação de resposta imune humoral 51

4.7 Necrópsia 52

4.8 Análise histopatológica 52

4.9 Ensaios imunoistoquímicos 53

4.10 Pesquisa de agentes secundários 54

4.11 Isolamento viral 55

4.12 Diagnóstico molecular por reação de transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) 56

4.12.1 Extração de RNA viral 56

4.12.2 Reação de transcrição reversa (RT) 57

4.12.3 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) 58

4.13 Análise estatística 58

5 RESULTADOS 59

5.1 Clínica 59

5.2 Exames hematológicos 59

5.3 Resposta imune humoral 61

5.4 Necrópsia 61

5.5 Histopatologia 62

5.6 Imunoistoquímica 70

5.7 Pesquisa de agentes secundários 70

5.8 Isolamento viral 70

5.9 Diagnóstico molecular 71

6 DISCUSSÃO 86

7 CONCLUSÕES 98

REFERÊNCIAS 99

ANEXOS 111

1 INTRODUÇÃO

Há no mundo cerca de 6000 espécies de répteis descritas, sendo que 468 destas ocorrem no Brasil. São 172 espécies endêmicas e 20 estão catalogadas como espécies em perigo de extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2003).

O conhecimento de enfermidades que acometem os répteis de vida livre é bastante reduzido, presumindo-se que nestas condições haja o equilíbrio entre hospedeiro-microorganismo. Quando o animal é transferido para o cativeiro este equilíbrio é desfeito e o microorganismo passa a ser patogênico para o hospedeiro (COOPER; WILLIANS, 1995). Assim como mamíferos e aves, os répteis são susceptíveis a uma gama variada de agentes, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas. Destas, a paramixovirose de serpentes (OPMV), a doença do corpúsculo de inclusão de boídeos (IBD), a micoplasmose e herpesvirose de quelônios, e a clamidiose em tartarugas verdes são importantes exemplos (JACOBSON, 1993).

A criação de algumas espécies em cativeiro tornou-se importante ferramenta na tentativa de salvá-los da extinção. Programas de reintrodução, repatriação e translocação (RRT) envolvendo répteis consistem em estratégias utilizadas para mitigar a perda de habitat, de populações e de indivíduos em áreas onde houve diminuição ou extinção destes. Embora alguns programas tenham sido bem sucedidos, muitos deles não obtiveram êxito ou não houve monitoramento dos animais após a soltura (JACOBSON, 1993).

O conhecimento da patogenia das infecções, assim como o da susceptibilidade dos animais às mais diversas enfermidades é de fundamental importância para o sucesso dos programas de manutenção das espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Boa constrictor*- **Aspectos Biológicos**

Serpentes da espécie *Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758) são popularmente conhecidas como jibóias, sendo sua classificação biológica abaixo descrita.

Classe Reptilia

Ordem Squamata

Família Boidae

Espécie *Boa constrictor*

Subespécies *B.c. constrictor, B.c. amarali, B.c. occidentalis, B.c. imperator, B.c. ortonni, B.c. nebulosus, B.c. sabogae, B.c. orophias, B.c. melanogaster, B.c. longicauda, B.c. sigma*

Sua distribuição geográfica vai da América Central até a Argentina, sendo subdividida em 11 subespécies. São serpentes constritoras, áglifas, não peçonhentas e de hábito arborícola, alimentando-se basicamente de roedores e aves. Podem, quando adultos, atingir até três metros de comprimento.

Sua criação em zoológicos ou por particulares é bastante difundida devido a sua exuberância, facilidade de adaptação ao cativeiro e relativa segurança, uma vez tratar-se de animais não peçonhentos.

2.2 Enfermidade em répteis

Os répteis são susceptíveis às mais diversas enfermidades, sejam elas de etiologia infecto-contagiosas, metabólicas, nutricionais ou neoplásicas.

Doenças de etiologia não infecto-parasitárias são descritas em serpentes, destacando-se a gota úrica visceral, retenção de ovos, disecdise, traumatismos e neoplasias (BARTEN, 1986; COOPER; JACKSON, 1981; DIAS; NICHOLS, 1996; JACOBSON et al., 1981; KANEENE et al., 1985; MORI, 1988; PAGAN; MÜLLER, 1990).

As doenças bacterianas representam importante papel como agentes secundários a infecções de etiologia viral ou parasitária (JACOBSON et al., 1992). Por outro lado, estudos epidemiológicos apontam as bactérias como os principais agentes etiológicos de enfermidades em répteis, sendo os bacilos Gram negativos os mais freqüentemente isolados (KANEENE, et al., 1985; SOVERI, et al., 1984). Em ofídios destacam-se as infecções causadas por *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, *Salmonella* sp, *Citrobacter* sp, *Escherichia coli*, *Providencia* sp , *Xanthomonas maltophila*, entre outras (CALIXTO et al., 1986; CAMBRE et al., 1980; COOPER; LEAKEY, 1976; FOELSCH; LELOUP, 1982; GÖBBEL et al., 1990; HEYWOOD, 1968; IIZUKA et al., 1984; JACOBSON et al., 1992; KOLESNIKOVAS et al., 2001; MAVRIDIS et al., 1993; MORENO et al., 1973; SELBITZ; ENGELMANN, 1984; SOVERI, 1985; ZACARIOTTI et al., 2000). Agentes Gram positivos também são eventualmente isolados, destacando-se *Streptococcus* sp e *Staphylococcus* sp (MADER; ROSENTHAL, 1996; MAVRIDIS et al., 1993).

Infecções micóticas são, na maioria das vezes, secundárias a outras doenças ou fatores predisponentes, nos quais podemos incluir o estresse, manutenção inadequada (temperatura e

umidade), uso prolongado de antibióticos e má nutrição. A maioria dos relatos diz respeito às micoses superficiais, porém micoses profundas também são encontradas. Grande parte dos fungos isolados a partir de casos clínicos é saprófita, isto é, comumente encontrados no solo ou plantas (MADER; ROSENTHAL, 1996). Há relatos de ocorrência de diversos agentes, entre eles o *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trycoderma*, *Geotichium*, *Rhisopus*, *Aspergillus*, Dermatiacea e Mucoracea (JACOBSON, 1980).

As serpentes podem ser acometidas por diversos gêneros de endo e ectoparasitas. Entre os ectoparasitas destacam-se aqueles pertencentes às famílias Ixodae, Laelapitidae, Entonyssidae, Ophioptidae, Trombiculidae e Pterygonidae, sendo o ácaro *Ophyonissus natricis* o mais freqüentemente citado em literatura (BAGGIO, 1983; FRANK; EISENBÜGEL, 1985). Em recente estudo realizado em serpentes jararaca (*Bothrops jararaca*), observou-se uma incidência de endoparasitose em 68% dos animais. Destes, 2,2% encontravam-se parasitados por *Caryospora* sp, 14,5% por *Sarcocystis* sp, 10% por *Porocephalus* sp, 6,4 % por *Ochetosoma heterocoelium*, 32,6% por *Rhabdias vellardi*, 36,2% por *Kalicephalus inermis*, 0,7% por *Kalicephalus costatus*, 14,7% por *Ophidascaris* sp (GREGO et al., 2000).

Mais recentemente as doenças de etiologia viral ganharam importância na medicina veterinária de serpentes, sendo descritos diversos problemas causados por DNA e RNA vírus. Na maioria dos casos o agente viral foi identificado apenas após a morte dos animais, sendo então o diagnóstico baseado em alterações anátomo-patológicas, ultra-estruturais e/ou isolamento viral (SCHUMACHER, 1996). Dentre os diversos tipos de vírus já estudados podemos citar o Herpesvirus de *Boa constrictor*, associado a necroses hepática e pancreática, com infiltrado mononuclear e inclusões nucleares (HAUSER et al., 1983). Por sua vez, o Adenovirus de serpentes foi descrito em *Boa constrictor* com sinais clínicos neurológicos e regurgitação de alimentos, e em um exemplar de “Rosy Boa” (*Lichanaura trivirgata)* que foi

a óbito sem sinais clínicos evidentes. Em ambos os casos observou-se a presença de corpúsculos intranucleares basofílicos em hepatócitos e células epiteliais renais (JACOBSON et al., 1985; SCHUMACHER et al., 1994). Em 1992, Ogawa et al. também isolaram partículas compatíveis com Adenovirus a partir de coração, fígado e rim de um exemplar de *Python regius.* Vírus da família Reoviridae foram identificados a partir de víboras chinesas *(Azmiops feyi*) que foram a óbito sem apresentar evidências clínicas de doença, sendo associadas a degeneração vacuolar em hepatócitos (SCHUMACHER, 1996). Outra importante enfermidade associada a vírus é a Doença do Corpúsculo de Inclusão de Boídeos (IBD), relacionada a sinais como regurgitação e alterações neurológicas, e presença de corpúsculos intracitoplasmáticos em rim, pâncreas e cérebro (OROS, et al., 1998; SCHUMACHER, et al., 1994; WOZNIAK, et al., 2000). Os Retrovirus são também associados à presença de neoplasias renais em caiçacas (*Bothrops moojeni*) mantidas em cativeiro (HOGE, 1997).

O Paramyxovirus de serpentes (OPMV) é descrito como agente causador de uma enfermidade importante em viperídeos, embora seja também descrito em boídeos e pitonídeos. Tal vírus está associado a epizootias com elevado índice de mortalidade e a sinais clínicos respiratórios e nervosos (BLAHAK, 1995; ESSBAUER ; AHNE, 2001; JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992; KOLESNIKOVAS, 2002; POTGIETER et al., 1987).

2.3 A Família Paramyxoviridae

2.3.1. Classificação

Os vírus da família Paramyxoviridae são envelopados, com cadeia negativa simples de RNA com aproximadamente 15 kb e relacionados a outras duas famílias de RNA vírus de cadeia simples, os Ortomyxoviridae e os Rhabdoviridae. Os Paramyxovirus codificam sua própria transcriptase, mas o RNA mensageiro (RNAm) é sintetizado apenas quando o vírus está dentro da célula hospedeira. A replicação viral ocorre após a síntese do RNAm e requer a produção contínua das proteínas virais (LAMB; KOLAKOFSKY, 1996).

Em 1993 o Comitê Internacional para a Taxonomia dos Vírus reclassificou a família em duas sub-famílias: Paramyxovirinae e Pneumovirinae. A subfamília Paramyxovirinae contém três gêneros, incluindo Parainfluenzavirus (Sendai Virus, Vírus da Parainfluenza humana tipos 1 e 3, Parainfluenza Bovina tipo 3), Rubulavirus (Parainfluenza Canina Tipo 3, Newcastle, Parainfluenza Humana tipo 2, caxumba) e Morbillivirus (sarampo, cinomose canina, morbilivirose de golfinhos, cinomose dos focídeos, Peste Bovina, Peste-des-petits dos ruminantes). A sub-família Pneumovirinae contém apenas o gênero Pneumovirus (LAMB E KOLAKOFSKY, 1996).

Estudos recentes propõem a classificação dos OPMV um novo gênero específico na sub-família Paramyxovirinae, os Paramyxovirus de Répteis (KINDERMANN et al, 2001).

2.3.2 Estrutura

Os Paramyxovirus são formados por diversos constituintes, incluindo a proteína de nucleocapsídeo (NP), fosfolipoproteína ou proteína polimerase-associada (P), hemaglutinina-neuraminidase (HN), membrana ou matriz protéica (M), proteína grande (L) e a proteína de fusão (F) composta pelas subunidades F1 e F2 (AZEVEDO et al., 2001). A descrição a seguir foi relatada por Lamb e Kolakofsky (1996).

A NP possui diversas funções relacionadas ao encapsulamento do genoma viral em um nucleocapsídeo RNAse resistente, associação com a P-L polimerase durante a transcrição e replicação, e a interação com a proteína M durante o agrupamento viral. A concentração intracelular do NP não agrupado parece ser o maior fator envolvido com o controle da transcrição e replicação.

Nos membros da sub-família Paramyxovirinae o gene P é responsável pela codificação de vários polipeptídeos, enquanto nos Pneumovirinae codifica apenas a proteína P. A proteína P é uma proteína modular com papel fundamental na síntese do RNA. Forma, juntamente com a proteína L, a polimerase viral, e com a NP não associada (NP), o complexo P-NP, provavelmente a forma ativa presente no processo de encapsulamento viral. Dentre outras proteínas codificadas pelo gene P estão: a proteína C, presente em virions e nucleocapsídeos isolados de virions e células; a V proteína, de função ainda indeterminada; e as proteínas W, I e D.

A proteína L é a menos abundante das proteínas estruturais e seu RNAm é o mais 5’distal, sendo o último a ser transcrito. Acredita-se ser esta a polimerase viral que, juntamente com a proteína P, são essenciais para a atividade polimerase.

A proteína M é a mais abundante no virion, havendo indícios de que está associada perifericamente às membranas, não sendo, portanto, uma proteína intrínseca destas.

A HN é uma proteína multifuncional e é o principal fator antigênico determinante nas paramixoviroses. Ela é responsável pela adsorção do vírus ao ácido siálico presente na membrana celular, e também atua enzimaticamente na separação entre o ácido siálico do virion e o da membrana celular.

As proteínas de fusão (F_1 e F_2) são produzidas na forma de um precursor inativo (F_0), clivado por enzimas hospedeiras proteolíticas. Estas proteínas são relacionadas à interação célula- hospedeiro e fusão celular, e quando presentes, propiciam a formação de sincícios em cultura celular.

2.3.3 Patogênese das infecções virais

A patogênese das infecções virais pode ser definida como o método pelo qual o vírus determina a doença no hospedeiro (TYLER; FIELDS, 1996). Muito do conhecimento sobre este tema é baseado em infecções experimentais em animais de laboratório. A descrição abaixo resumida é baseada em dados publicados por Tyler e Fields (1996).

A patogênese das infecções virais depende de diversos fatores, dentre elas podemos citar: adsorção (entrada no organismo), replicação primária (penetração), distribuição pelo organismo, tropismo celular, resposta imune, replicação secundária, dano celular e persistência da virose.

As diversas viroses que acometem os animais podem invadir o organismo por diferentes vias de entrada, incluindo, dentre outras, as vias cutânea, respiratória, geniturinária

e conjuntiva. As viroses que utilizam o trato respiratório como porta de entrada encontram nela diversas barreiras naturais contra a infecção, tais como a presença de imunoglobulinas (Ig A), secreção de muco, presença de células ciliares e a baixa temperatura das vias respiratórias superiores. Existem ainda populações de macrófagos e outras células fagocíticas que estão presentes nos alvéolos pulmonares.

Alguns vírus, como o Influenza, Parainfluenza, Rhinovirus, Coronavirus, Rotavirus e Papilomavirus, caracterizam-se por um padrão focal de lesão próximo ao sítio de entrada no hospedeiro. Raramente há uma dispersão além da barreira das células epiteliais acometidas, porém a invasão e infecção sistêmica não podem ser descartadas. Os fatores que determinam o padrão de lesão não são suficientemente conhecidos. A superfície de eliminação do vírus pela célula epitelial determina se a infecção será localizada ou sistêmica. Se esta ocorrer pela região do lúmen, o padrão será localizado; se pela superfície estromal, haverá uma tendência a generalização do processo.

A distribuição do vírus pelo organismo pode ocorrer por duas vias principais: hematógena e neural. O evento sucessivo à replicação primária no sítio de entrada é a colonização de linfonodos regionais, seguindo-se o acesso para vasos linfáticos eferentes e circulação sistêmica. Em alguns casos, a replicação primária no sítio de entrada é seguida por uma viremia de baixo título (viremia primária) que ajudará a colonização de locais como o sistema mononuclear fagocitário, facilitando uma viremia secundária. A replicação continuada no sítio primário promove um constante afluxo de partículas virais na circulação. Concomitantemente a este afluxo de vírus ao sangue, diversos mecanismos de defesa do hospedeiro tentam eliminá-lo. A magnitude da viremia é resultante da correlação entre estes dois eventos. O sistema de defesa está formado por diversos elementos, incluindo, dentre outros, macrófagos, linfócitos, sistema complemento e anticorpos.

O tropismo, isto é, a capacidade do vírus em infectar determinado órgão ou pequenas populações celulares dentro deste, depende de fatores como presença de receptores virais na célula e de proteínas de ligação na superfície viral, além de características da interação ocorrida entre células e vírus. Os fatores inerentes ao vírus, como as proteínas de envelope, de nucleocapsídeo, matriz e proteínas não estruturais, são determinados geneticamente.

2.3.4 Susceptibilidade do hospedeiro

O sucesso da infecção viral está intimamente relacionada a fatores intrínsecos do hospedeiro, sendo que estudos populacionais em humanos demonstram que um mesmo patógeno pode determinar desde doença clinicamente assintomática até a morte. Dentre estes fatores podemos citar: estado imune, determinantes genéticos, idade, estado hormonal, hábitos individuais, padrão de resposta inflamatória e fatores enzimáticos (TYLER ; FIELDS, 1996).

Estudos realizados com Sendai Vírus e Vírus de Newcastle indicam que a localização e extensão das lesões provocadas dependem de: (a) viabilidade dos receptores para a adesão viral e a especificidade da proteína de adesão HN; (b) o padrão de clivagem de F_0 e as diferenças nas proteases; (c) sítios de ligação celular, influenciados pela proteína M; (d) outros fatores virais não identificados (COLLINS et al., 1996).

O “status” imune do hospedeiro também é considerado fator importante na distribuição do vírus pelo organismo, sendo que estudos realizados com animais imunossuprimidos indicam que há disseminação e infecção produtiva em diversos órgãos após infecção experimental (COLLINS et al., 1996).

2.3.5 Infecções virais persistentes

Alguns vírus da família Paramyxoviridae apresentam um padrão crônico de infecção, podendo ser citadas a pancefalite esclerótica subaguda (SSP), forma persistente do sarampo, e a encefalite dos cães idosos e hiperqueratose de patas em cachorros adultos, relacionados ao vírus da cinomose (GRIFFIN; BELLINI, 1996).

Para persistir no organismo animal o vírus utiliza diversas estratégias, entre elas: (a) expressão restrita do gene, ou seja, o vírus permanece latente na célula com expressão gênica mínima ou ausente; (b) variação antigênica por mutação em sítios de reconhecimento pelo anticorpo ou por células T; (c) supressão de moléculas de reconhecimento por células T; (d) presença de moléculas que interferem na função das citocinas; (e) tolerância imunológica; (f) infecção em sítios não acessíveis ao sistema imune (AHMED et al., 1996).

O fenômeno de persistência do vírus do sarampo já foi demonstrado em culturas celulares, onde há uma replicação lenta com pequena ou nula produção de partículas extracelulares. Esse padrão de cultura mimetiza o padrão lesional da SSP, com uma retenção intracelular de nucleocapsídeos virais e pouca expressão de antígenos na superfície da membrana (AHMED et al., 1996).

Os Herpesvirus, em especial, o Herpesvirus Simplex, apresentam um padrão latente de infecção em neurônios sensoriais. A expressão gênica é limitada, com o vírus mantido em uma forma quiescente. O estímulo para a reativação viral, no caso dos humanos, incluem, dentre outros, a imunossupressão, alterações hormonais, estresse, neurectomia e exposição aos raios ultravioleta. Estudos demonstraram que durante uma infecção latente em gânglios

sensoriais a presença do vírus pode ser demonstrada por técnica de southern blot ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (AHMED et al., 1996).

2. 4 O Paramixovírus de serpentes (OPMV)

2.4.1 Histórico

A primeira descrição do Paramyxovirus de Serpentes (OPMV) foi realizada por Foelsch e Leloup (1976), num surto de doença respiratória e nervosa com altos índices de mortalidade em serpentes *Bothrops moojeni* mantidas num serpentário particular na Suíça. O vírus foi classificado a partir de suas características morfológicas dentro da Família Paramyxoviridae. Desde então diversas partículas "paramyxovirus-simile" foram isoladas a partir de serpentes, quelônios e lagartos em vários países (BLAHAK, 1995; JACOBSON et al.,1981; JACOBSON et al.,1992; POTGIETER et al., 1987). O OPMV já foi descrito em serpentes das famílias Boidae, Elapidae, Colubridae, Crotalidae e Viperidae (ESSBAUER; AHNE, 2001).

Apesar da primeira descrição de paramixovirose ter ocorrido em serpentes originárias do Brasil, os primeiros relatos da virose no país foram realizados apenas recentemente. A presença do vírus já foi demonstrada em: (a) glândula de veneno de jararaca através do seqüenciamento parcial do gene de uma proteína de fusão (AZEVEDO et al., 2001); (b) filhotes de urutus (*Bothrops alternatus*) com sinais clínicos neurológicos, diagnosticado por isolamento e detecção viral por Transcrição Reversa-Reação de Amplificação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), e ensaio imunoistoquímico (KOLESNIKOVAS et al., 2002); (c)

cascavéis (*Crotalus durissus)* com sinais clínicos respiratórios, pela utilização da técnica de PCR e isolamento viral (NOGUEIRA et al., 2001).

2.4.2 Caracterização e classificação

O OPMV quando inoculado em cultura celular induz a formação de sincícios, ou, dependendo da cepa viral, a ausência de efeitos citopáticos, não havendo formação de corpúsculos intracitoplasmáticos. Ultraestruturalmente, os OPMV são pleomórficos, com diâmetros variando de 30 a 500nm, dependendo da cepa isolada, e quando intactos, apresentam um nucleocapsídeo helicoidal. São capazes de aglutinar hemácias de galinhas e outras espécies animais, possuindo também atividade de neuraminidase. Os vírus são sensíveis ao éter, ácidos e pH básico (RICHTER et al., 1996).

Estudos filogenéticos, realizados através do seqüenciamento de fragmentos dos genes HN e L, possibilitaram uma classificação mais correta do OPMV dentro da família Paramyxoviridae. O primeiro destes estudos foi realizado por Ahne et al. (2001), onde através da análise do seqüenciamento parcial dos genes L e HN de 16 isolados, os OPMV foram subdivididos em dois grupos distintos, subgrupos “a” e “b”. A divergência gênica entre estes dois subgrupos é relativamente alta, entre 20 e 22%, indicando pertencerem, talvez, a duas linhagens distintas. Porém, a divergência de nucleotídeos dentro de cada subgrupo é baixa, cerca de 2,5%. Todos os membros do subgrupo “a” foram isolados nos Estados Unidos, entre 1995 e 1998. No subgrupo “b” havia cinco isolados procedentes da Alemanha entre 1986 e 1994, e um americano, de 1996.

Através da identificação e caracterização molecular dos genes HN e L e posterior comparação com outros vírus da família Paramyxoviridae (Sendai Vírus, caxumba, sarampo, vírus respiratório sincicial humano), observou-se que os OPMV possuem máxima similaridade com gene parcial-L de Sendai vírus, com homologia em 56% de nucleotídeos e 61% de aminoácidos. Considerando-se as características biológicas, a distância antigênica e, particularmente, a baixa homologia encontrada nas seqüências gênicas disponíveis, sugere-se a classificação dos OPMV em um gênero distinto dentro da família Paramyxoviridae e subfamília Paramyxovirinae, o gênero Paramyxovirus de Répteis (FRANKE et al., 2001; KINDERMANN et al., 2001). Desta forma, de acordo com a proposta acima descrita, a classificação do OPMV seria:

Ordem: Mononegavirales

Família: Paramyxoviridae

Subfamília: Paramyxovirinae

Gênero: Paramyxovirus de Serpentes

2.4.3 Sinais clínicos e estudos anátomo - patológicos

A primeira descrição do OPMV ocorreu em um serpentário particular na Suíça durante um surto acometendo *Bothrops moojeni*, com alto índice de mortalidade, associado a sinais respiratórios e letargia (FOELSCH; LELOUP, 1976).

Entre os sinais clínicos observados pode-se destacar regurgitação, presença de fezes mucosas esverdeadas, anorexia, seguidos de aberturas rápidas da cavidade oral, muitas vezes

com expulsão de conteúdo de coloração marrom, culminando com convulsão e morte. Porém, alguns animais podem vir a óbito sem a manifestação clínica da doença (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992).

Macroscopicamente, em pulmão podem ser observados a presença de conteúdo mucoso ou caseoso, edema, hemorragia e congestão, além da presença de nódulos brancos em superfície hepática (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al.,1992).

A análise microscópica do pulmão demonstra a presença de degeneração epitelial marcante, infiltrado mononuclear, presença intersticial de heterófilos, hipertrofia epitelial, edema, congestão e presença de colônias bacterianas. Em alguns animais pode-se observar inclusões citoplasmáticas eosinofílicas em células epiteliais. Em fígado observa-se degeneração vacuolar, congestão de sinusóides, inflamação piogranulomatosa, necrose, presença de pigmentos castanhos em hepatócitos e hiperplasia biliar. As lesões pancreáticas caracterizam-se por distribuição multifocal de necrose, hiperplasias ductal e acinar. Em trato gastrointestinal pode-se, eventualmente, observar gastrite, colite ou enterite. No rim há relato de presença de necrose focal associada à presença de bacilos em um animal (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al, 1992). Histologicamente as lesões nervosas observadas englobam degeneração neuronal, gliose e desmielinização (JACOBSON et al., 1980). Mais recentemente, diagnosticou-se meningoencefalite linfocítica multifocal com gliose em um exemplar de *Morelia boeleni* mantida no Zoológico de San Antonio-EUA, sendo que as lesões caracterizaram-se por degeneração neuronal e presença de corpúsculos intracitoplasmáticos em células da glia (WEST et al., 2001).

O OPMV é associado a infecções bacterianas secundárias, principalmente por bacilos Gram negativos. Entre eles podemos citar *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella arizonae*, *Providencia rettgeri*, *Xanthomonas maltophila*, *Proteus mirabillis*,

Escherichia coli, *Serratia marcescens* e *Aeromonas hydrophila* (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992).

2.4.4 Métodos diagnósticos

Os primeiros relatos sobre o OPMV basearam-se na caracterização morfológica do vírus através de sua análise ultraestrutural (FOLESCH e LELOUP, 1976). Posteriormente outros métodos, como o isolamento em cultura celular, hemaglutinação (H.A.), inibição de hemaglutinação (H.I.), imunoistoquímica e análise molecular foram descritos (AHNE et al., 1999; CLARK et al., 1979; HOMER et al., 1995; JACOBSON et al., 1981; POTGIEGER; SIEGER; RUSSEL, 1987).

2.4.4.1 Análise Ultraestrutural

A análise ultraestrutural do vírus pode ser realizada através de técnicas rotineiras de coloração negativa de isolados virais, ou de coloração por metais pesados em cortes ultrafinos observados em microscópio eletrônico de transmissão (JACOBSON et al., 1992; JACOBSON et al., 1997; MANVELL et al., 2000).

2.4.4.2 Isolamento Viral

Os OPMV podem ser cultivados em diversas linhagens de células de répteis e mamíferos, assim como em ovos embrionados de galinhas (CLARK et al., 1979; BLAHAK, 1995). O isolamento em cultura de células é realizado em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e solução de antibióticos. As células são incubadas a 28-30ºC e analisadas diariamente para a observação de efeitos citopáticos característicos, ou seja, formação de sincícios. Em alguns isolados porém, podem não ser observadas alterações morfológicas nas culturas celulares (AHNE et al., 1999; JACOBSON, et al., 1981; RICHTER et al.; 1996).

2.4.4.3 Hemaglutinação (H.A.) e inibição de hemaglutinação (H.I.)

Valendo-se da característica dos Paramixovírus em aglutinar hemácias das mais diferentes espécies de animais, o teste de H.A. pode ser utilizado como método diagnóstico para estas viroses. A H.A. sangue de galinhas é utilizada como padrão para o diagnóstico de OPMV. Diluições seriadas da amostra a ser testada são realizadas em microplacas e incubadas com solução 0,5% de hemácias de galinha a 4ºC ou temperatura ambiente (CLARK et al., 1979; RICHTER et al.; 1996).

O teste de H.I. foi desenvolvido como forma de determinação da resposta imune humoral para a paramixovirose de serpentes. A positividade neste teste determina a exposição do hospedeiro ao agente viral (JACOBSON et al., 1992).

2.4.4.4 Imunoistoquímica

Os ensaios imunoistoquímicos são ferramentas importantes para estudos retrospectivos da paramixovirose, uma vez que podem ser realizados em tecidos já fixados (HOMER et al., 1995; ÓROS et al., 2001). A detecção da presença do vírus através de reação de imunoperoxidase foi padronizada por Homer et al. (1995).

2.4.4.5 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular da paramixovirose de répteis foi possível a partir do seqüenciamento parcial dos genes L e HN do vírus (AHNE et al., 1999). Utilizando-se as seqüências gênicas obtidas no estudo, foi possível a outros autores, através da técnica de RT-PCR, realizarem diagnósticos da virose (KOLESNIKOVAS et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2001). A relação das seqüências gênicas descrita por Ahne et al. (1999) está expressa na tabela 1.

Tabela 1. Seqüências gênicas para síntese de “primers” para utilização na técnica de RT-PCR (AHNE et al., 1999).

Primer	Seqüência Gênica	Produto esperado
HN 1	5’- AAATCCTGCAGTACCGTGGCA- 3’	679 pb
2	5’- AGATATCTGTGTAAACTCCTG- 3’	
3	5’- GCACTCTACCCCAGTGTTGG- 3’	399 pb
4	5’- TTCTATCCAGCTTATTCTTAT- 3’	
L 1	5’- GCAGAGATTTTCTCTTTCTT- 3’	627 pb
2	5’- AGCTCTCATTTTGTATGTCAT- 3’	
	5’- TAGAGGCTGTTACTGCTGC- 3’	566 pb
	5’- CATCTTGGCAAATAATCTGCC- 3’	

2.5 Estudos experimentais

Há na literatura apenas um relato sobre estudos de infecção experimental por OPMV em serpentes. Este estudo descreve as lesões pulmonares que ocorrem após a inoculação do vírus via endotraqueal em “Aruba Island Rattlesnake” (*Crotalus unicolor*) (JACOBSON et al., 1997).

Neste trabalho, as serpentes foram subdivididas em dois grupos e inoculadas com suspensão de 1,0 ml de OPMV diluído a 1:256. No Grupo I, composto por seis animais (5 Fêmeas, 1 Macho), um indivíduo foi utilizado como controle negativo e os demais inoculados

com a suspensão viral. Três das serpentes foram submetidas à eutanásia aos quatro, oito e 15 dias após a inoculação (dPI) e as restantes foram encontradas mortas após 19 e 21 dPI. No Grupo II, três animais (1 F, 2 M) foram inoculados e também submetidos à eutanásia aos quatro, oito e 15 dPI.

As alterações macroscópicas observadas nos animais que apresentaram morte natural foram: extensa hemorragia em pulmão e saco aéreo aos 19 dPI; exsudação muco-purulenta e espessamento septal pulmonar aos 21 dPI; presença de conteúdo sangüinolento em cavidade oral em ambos animais. Por sua vez, nos animais submetidos à eutanásia, o principal achado macroscópico foi a presença de exsudação pulmonar aos cinco dPI.

Histologicamente pode-se notar uma progressão das lesões pulmonares entre os quatro e 21 dPI. Aos quatro dPI foram observados agregados de heterófilos em interstício septal e linearmente sob as células epiteliais. Após oito dPI as lesões caracterizaram-se pela presença de debris celulares, heterófilos e hemácias, com hiperplasia moderada de epitélio traqueal; espessamento, edema, infiltrados heterofílico, linfocítico e macrofágico em pulmão anterior, médio e caudal. As lesões da porção cranial do pulmão apresentaram-se mais severas do que as demais. Aos 15 dPI as alterações pulmonares observadas incluíram espessamento de septos pela presença de edema, agregados linfóides, heterófilos e macrófagos. Neste grupo foi também observada a presença de células epiteliais com aspecto cubóide. A necrose de coagulação pôde ser diagnosticada aos 19 dPI, com presença de células epiteliais cubóides e corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos em células da porção média do pulmão. Finalmente, aos 21 dPI houve o espessamento intersticial com presença de heterófilos, sendo que os alvéolos estavam repletos de fibrina, heterófilos degenerados e eritrócitos. Também neste grupo ocorreu um maior acometimento da porção cranial do órgão.

Exames de imunofluorescência foram realizados e demonstraram uma maior positividade após oito dPI, com marcação mais acentuada em porção cranial do pulmão. A

análise ultraestrutural realizada confirmou os achados observados em exames histopatológicos.

Nenhum dos animais apresentou titulação para H.I. Para os autores do trabalho, esta negatividade está relacionada ao período necessário para a soroconversão dos animais, ou seja, seis a oito semanas após o contato com o agente viral (JACOBSON et al., 1995).

2.6 OPMV em boídeos

Em surtos causados por OPMV a morbidade, assim como a mortalidade, entre serpentes da Família Viperidae é mais relevante do que nas demais famílias. Em um surto ocorrido no "Louisiania Purchase Gardens and Zoo" – EUA, 8% da população de viperídeos veio a óbito, não havendo descrição de morte de boídeos (JACOBSON et al., 1981). Em outro relato ocorrido no "Audubon Park and Zoological Garden"- New Orleans- EUA, dentre 42 ofídeos que vieram a óbito, apenas dois pertenciam à Família Boidae (*Boa constrictor occidentalis*, *Corallus caninus*), sendo que as lesões histopatológicas observadas nestes indivíduos não puderam ser associadas ao OPMV (JACOBSON et al., 1992) .

Mais recentemente, ocorreram relatos de paramixovirose em serpentes da família Pythonidae, grupo este geneticamente próximo à Boidae. Em um relato de caso no Reino Unido, o OPMV foi isolado a partir de biópsia pulmonar de um exemplar de *Phyton reticulatus* com histórico de secreção nasal e ruídos respiratórios (MANVELL et al., 2000). Em outra publicação, um exemplar de *Morelia boeleni* com sinais neurológicos foi submetida à eutanásia e, a partir de fragmentos de cérebro, a paramixovirose pôde ser diagnosticada através de suas características ultraestruturais e hibridização *in situ* (WEST et al., 2001).

2.7 Hematologia em serpentes e resposta inflamatória

Há na literatura diversos trabalhos sobre a hematologia de serpentes, porém a classificação dos tipos celulares existentes é bastante controversa (TUCUNDUVA et al., 2001).

De acordo com trabalhos recentes, as células sangüíneas de répteis podem ser classificadas em eritrócitos, leucócitos e trombócitos (análogos às plaquetas dos mamíferos). Os eritrócitos dos répteis são nucleados e similares dentre as diversas famílias. Nestes animais os linfócitos e trombócitos são morfologicamente semelhantes, porém existem diferenças consideráveis dentre os leucócitos granulócitos e mononucleares. Há ainda controvérsias relacionadas aos tipos de leucócitos existentes. Os azurófilos são observados com freqüência na ordem Squamata (serpentes e lagartos) e Crocodilia (aligatores, jacarés, crocodilos, gavial), mas raramente observados em Chelonia. Já os eosinófilos estão presentes em Crocodilia e Chelonia, sendo ausentes em Squamata (ALLEMAN et al., 1999).

Em estudo citoquímico realizado em serpentes *Crotalus adamanteus* sadias foi descrita a presença de quatro tipos de leucócitos: heterófilos (6,0%), linfócitos (78%), azurófilos (15%), basófilos (1,0%) (ALLEMAN et al., 1999). Em *Boa constrictor* induzidas experimentalmente a uma resposta inflamatória por implante de fio de algodão em tecido subcutâneo, Tucunduva et al. (2001) descreveram a presença, no sangue periférico, de azurófilos (66%), heterófilos (25%), monócitos (5%) e outros (4%).

Os linfócitos são o leucócito de maior prevalência no sangue da maioria dos répteis. Possuem propriedades tintoriais basofílicas, com citoplasma escasso, podendo apresentar grânulos azurofílicos. Seu núcleo é grande e centralizado, com a cromatina pouco densa. O

aumento do número de células circulantes está correlacionado a processos inflamatórios, cicatrização de tecidos, infecções parasitárias ou virais (ALLEMAN et al., 1999; CAMPBELL, 1996; SYPEK; BORYSENKO, 1988).

Os heterófilos são células arredondadas, possuem núcleo excêntrico e grânulos fusiformes eosinofílicos. Sua função primária, baseada em estudos ultraestruturais, é a fagocitose. Participam de processos inflamatórios e têm o número aumentado em infecções por microorganismos, parasitas e traumas. Outros fatores como estresse, neoplasia e leucemia mielóide podem afetar o número de heterófilos circulantes (ALLEMAN et al., 1999; CAMPBELL, 1996; SYPEK; BORYSENKO, 1988). Estudos demonstram haver uma certa analogia entre os heterófilos dos répteis e os neutrófilos dos mamíferos (TUCUNDUVA et al., 2001), uma vez que estas são as primeiras células mobilizadas para o tecido inflamado.

Os basófilos são semelhantes dentre os diversos gêneros de répteis, possuindo granulações arredondadas e basofílicas. A contagem total destes granulócitos pode estar aumentada na presença de hemoparasitas e processo infeccioso por vírus, tais como os Iridovirus (ALLEMAN et al., 1999; CAMPBELL, 1996; SYPEK; BORYSENKO, 1988).

Os monócitos apresentam grânulos azurofílicos em seu citoplasma, sendo comumente denominados azurófilos (CAMPBELL, 1996). Os azurófilos possuem núcleo excêntrico, pequena quantidade de vacúolos citoplasmáticos e o aumento destas células na circulação está associado a processos de etiologia bacteriana (ALLEMAN et al., 1999; CAMPBELL, 1996).

O padrão típico de resposta inflamatória nos répteis é a formação de granulomas heterofílicos, que inicia-se com o acúmulo de heterófilos, seguido da degranulação e necrose destas células (MONTALI, 1988).

Estudo sobre a resposta inflamatória induzida por implante de fio de sutura em *Boa constrictor* demonstrou que, após quatro horas de indução, há uma predominância de heterófilos e macrófagos; um dia após há considerável aumento de células no local da

inflamação, com persistência dos mesmos tipos celulares; aos dois dias, pode-se notar a presença de debris celulares no interior de macrófagos; aos sete dias observa-se a formação de células gigantes ao redor da sutura, associadas a heterófilos; aos 15 dias há um aumento de camadas celulares ao redor da sutura; a organização da lesão pode ser diagnosticada aos 69 dias, com a persistência de heterófilos e macrófagos; aos 117 dias ainda pode ser notada a presença de macrófagos e heterófilos no sítio inflamatório (TUCUNDUVA et al., 2001).

2.8 Resposta imune

Os répteis são capazes, como todos os demais vertebrados, de apresentar tanto a resposta imune de base celular, quanto a de base humoral. Porém, forma como os granulócitos e monócitos participam na resposta imune dos répteis não está claramente elucidada (GUILLETTE, et al., 1995).

Estudos realizados com diversas espécies de répteis demonstram que estes animais são capazes de produzir ao menos duas classes de imunoglobulinas: IgM e IgY. A IgM reptiliana está intimanente correlacionada à análoga dos mamíferos, enquanto a IgY pode ser comparada à IgG (GUILLETTE, et al., 1995; MONTALI, 1988; SYPEK; BORYSENKO, 1988).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para a compreensão da patogenia da infecção por OPMV em *Boa constrictor*. Para tanto, os objetivos específicos do estudo após a inoculação experimental de OPMV em *Boa constrictor* foram:

- avaliar a distribuição do vírus no organismo
- investigar as lesões induzidas pelo vírus
- analisar o comportamento da resposta imune humoral causada pelo vírus

4 MATERIAL E MÉTODO

Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA – protocolo nº 02027.002445/02-27) e pelas Comissões de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP - nº 074/2002) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP - nº 33/2002).

4.1 Animais

Foram utilizadas doze exemplares de serpentes *Boa constrictor* (5 Machos, 7 Fêmeas), de idade e peso semelhantes, provenientes da Operação de Resgate de Fauna da Usina Hidroelétrica de Manso- Mato Grosso- Brasil, gentilmente cedidas por Furnas Centrais Elétricas.

Os animais foram recebidos em dois lotes nos meses de maio e setembro de 2000. À chegada foram medidos, pesados e submetidos a exames clínicos. A partir de amostras de sangue e fezes foram realizados hemograma, de bioquímica sangüínea e coproparasitológicos, além da avaliação de resposta imune humoral para OPMV. A distribuição dos animais em relação ao sexo, peso e comprimento está descrita na tabela 2.

Tabela 2 Distribuição dos animais utilizados no experimento em relação ao sexo, comprimento e peso.

Animal	Sexo	Peso (g)	Comprimento (cm)
1	M	850,00	1050,00
2	M	1420,00	1320,00
3	M	1360,00	1300,00
4	F	1480,00	1400,00
5	F	1120,00	1230,00
6	F	1020,00	1190,00
7	M	1290,00	1300,00
8	F	985,00	1100,00
9	F	1100,00	1210,00
10	M	870,00	1200,00
11	F	1610,00	1460,00
12	M	1180,00	1250,00

As serpentes foram numeradas e mantidas em caixas plásticas individuais junto à Sala de Experimentação de Animais Ectotérmicos do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM)-Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT-FMVZ-USP). A temperatura ambiente foi controlada artificialmente, sendo mantida entre 26º e 28º Celsius. Os animais eram alimentados quinzenalmente com camundongos doados pelo Biotério do VPT-FMVZ–USP. A água era fornecida “ad libitum”. As serpentes foram mantidas por aproximadamente um ano e meio em cativeiro, e utilizadas no estudo apenas após a estabilização dos parâmetros hematológicos. Nenhum animal apresentou alterações clínicas no período pré-experimentação.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram subdivididos em grupos obedecendo-se a seguinte escala:

- A: 1 animal (1 M) controle prévio, submetido à eutanásia antes do período experimental (nº 1)

- B: 2 animais (2 M) submetidos à eutanásia 3 dias após inoculação - dPI-(nºs 2 e3)

- C: 2 animais (2 F) submetidos à eutanásia 7 dPI (nºs 4 e 5)

- D: 2 animais (1 M, 1 F) submetidos à eutanásia 14 dPI (nºs 6 e 7)

- E: 2 animais (2 F) submetidos à eutanásia 21 dPI (nºs 8 e 9)

- F: 2 animais (1 M, 1 F) submetidos à eutanásia 2 meses PI (nºs 10 e 11)

- G: 1 animal (1 F) controle posterior, submetido à eutanásia após o período experimental (nº12)

4.3 Inóculo e inoculação

Como inóculo foi utilizada amostra de OPMV mantida em monocamada de célula de coração de viperídeo (VHC; American type collection, Rockville, Maryland 20852, EUA) gentilmente cedida pelo Dr. Elliott Jacobson, Universidade da Flórida. A amostra empregada é proveniente de isolado obtido a partir de diversos órgãos de “Aruba Island Rattlesnake” e gentilmente cedidos pelo Prof. Donald Nichols, Departamento de Patologia do “National Zoological Park”, Washington, D.C., EUA.

O vírus, mantido no Laboratório de Virologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foi inoculado em garrafas plásticas de cultivo celular contendo monocamadas de VHC em meio mínimo essencial de Eagle (MEM Cultilab, Campinas, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, Brasil) e antibióticos (Penicilina G 100 U/ml e Estreptomicina 0,1 mg/ ml). A leitura para observação de efeito citopático característico (formação de sincícios) foi realizada diariamente. A suspensão viral foi então congelada e descongelada por três vezes para a liberação de partículas virais e posteriormente submetido ao teste de H.A., obtendo-se título de 256.

Como inóculo foi utilizado 1,0 ml de suspensão viral diluída a 8,0 unidades hemaglutinantes (1:32), via endotraqueal através de sondas uretrais estéreis (nº 4). Para a realização deste procedimento os animais encontravam-se sedados com solução de tiletamina e zolazepam na dose de 10 mg/kg (Zoletil®- Virbac- São Paulo- Brasil).

4.4 Colheita de sangue e lavados traqueais

A colheita de sangue foi realizada através de agulha 25x5mm e seringas plásticas estéreis por punção cardíaca, com o animal sedado. O procedimento foi adotado mensalmente para cada animal desde o recebimento até a realização do experimento, e nos tempos determinados pelo protocolo experimental.

Os lavados traqueais foram realizados, também com o animal sedado, antes do experimento e nos tempos determinados pelo protocolo. Através da introdução de sonda uretral estéril (nº 4) na traquéia do animal, 5,0 ml de MEM estéril foram inoculados e

imediatamente aspirados do pulmão. O conteúdo obtido foi utilizado para exames de isolamento e diagnóstico molecular do vírus.

4.5 Hemograma

Para a realização do hemograma nos tempos pré-experimentação e controle, foram utilizados 1,5 ml de sangue de cada animal. Após a inoculação do vírus, a mesma quantidade foi colhida dos animais submetidos à eutanásia, sendo que dos demais indivíduos foram colhidos apenas 0,5 ml.

4.5.1 Contagem diferencial de células

Para a realização de extensão sangüínea para contagem diferencial de células foi utilizada uma gota de sangue sem conservantes logo após a colheita do material. A fixação da lâmina foi realizada em metanol por três minutos, seguida da coloração com corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). O corante foi colocado sobre a lâmina por 13 minutos e retirado através de lavagem com água destilada. A contagem diferencial das células foi realizada com auxílio de microscópio óptico (Olympus®) sob aumento de 1.000 vezes e do contador digital de células Leucotron®. Para cada lâmina foi contado um total de 100 leucócitos e os resultados expressos em valores porcentuais.

4.5.2 Hemograma

O hemograma foi realizado com sangue adicionado ao anticoagulante heparina sódica (Liquemine®- Park Davis). Os procedimentos adotados foram preconizados por Coles (1984).

O hematócrito (Ht) foi determinado pela técnica de microhematócrito. Tubos capilares foram preenchidos e vedados em uma de suas extremidades com massa própria para este fim. Os tubos foram então centrifugados por cinco minutos a 10.000 rpm (Centrífuga de Microhematócrito®- Fanem). O volume de células aglutinadas foi determinado com auxílio de cartão padrão para leitura de hematócrito.

Para as contagens de hemácias (He), leucócitos (Leu) e trombócitos (Tro) totais, 10 μl de sangue total foram diluídos 2,0 ml de solução de Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1952), perfazendo uma diluição de 1:200. A solução foi então homogeneizada e utilizada para o preenchimento de Câmara de Neubauer, seguindo-se a leitura em microscópio óptico em aumento 400X. O número de eritrócitos foi determinado pela contagem de células presentes em 5/25 do retículo central, enquanto o número de leucócitos e trombócitos foi obtido através da contagem das células nos 16 quadrantes externos de linha simples.

A dosagem de hemoglobina (Hb) foi realizada pelo método da cianometahemoglobina com a utilização de kit comercial (Hemoglobina®-Labtest), seguida da análise espectofotométrica em analisador semi-automático LabQuest® (Labtest), conforme orientações do fabricante.

Os valores dos índices hematimétricos (VCM-volume corpuscular médio; HCM-hemoglobina corpuscular média; CHCM-concentração hemoglobínica corpuscular média)

foram determinados através de cálculos padronizados, valendo-se das seguintes fórmulas (COLES, 1984):

$$VCM = \frac{Ht \times 10}{He} \qquad HCM = \frac{Hb \times 10}{He} \qquad CHCM = \frac{Ht \times 100}{Hb}$$

4.6 Determinação de resposta imune humoral

A determinação da resposta imune humoral para o OPMV foi realizada pela técnica de H.I., a partir de plasma dos animais obtido após a colheita de sangue descrita no item 4.4.

A amostra a ser testada foi diluída na proporção 1:10 em PBS (pH 7,4) e incubada por 30 minutos em banho-maria a 56ºC. A adsorção, pela adição de 1,0 ml de hemácias de galinhas previamente lavadas e centrifugadas, foi realizada pelo período de uma hora em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então utilizado para a determinação da resposta imune humoral ao antígeno.

A dosagem foi realizada em microplacas de 96 cavidades. Inicialmente foram adicionados a cada cavidade 50 μl de PBS a 0,1% de soroalbumina bovina (BSA), acrescentando-se em seguida 100 μl da amostra à primeira cavidade. A partir desta primeira cavidade, diluições seriadas (base 2) foram realizadas. Posteriormente, 50 μl de solução viral a oito unidades hemaglutinantes foram adicionados a cada cavidade. As placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente e depois adicionadas a 50 μl de hemácias de galinha 0,5%, por duas horas a 4ºC.

4.7 Necrópsia

Nos tempos determinados pelo protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia através da administração de solução de tiletamina e zolazepam (Zoletil®-Virbac-São Paulo-Brasil), 10 mg/kg e posterior administração de dose mínima de 300 mg/kg de cloridrato de quetamina (Vetanarcol®- König- São Paulo- Brasil)

A necrópsia completa e detalhada foi realizada seguindo-se o protocolo de Kolesnikovas (1997). Fragmentos de tecidos foram então colhidos para análise histopatológica, imunoistoquímica, diagnóstico molecular, isolamentos bacteriano, fúngico e viral.

4.8 Análise histopatológica

Para o exame histopatológico foram colhidos fragmentos representativos de todos os tecidos dos animais. A fixação foi realizada em solução de formol 10% por 24 horas, transferindo-se então o material para etanol 70% até o encaminhamento das amostras ao Laboratório de Histopatologia do VPT-FMVZ-USP. O material foi processado de acordo com técnicas rotineiras de inclusão em parafina (PROPHET, 1991). Corte de 5 μm foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), e observados com o auxílio de microscópio óptico (Olympus BMax®).

4.9 Ensaios imunoistoquímicos

Os ensaios imunoistoquímicos foram baseados na metodologia descrita por Homer et al. (1995).

Para a produção de anticorpo policlonal anti-OPMV, uma suspensão do vírus, cultivada em monocamadas de células Vero, foi preparada por congelamento e descongelamento, centrifugada para retirada de debris celulares, ultracentrifugada a 21.000 rpm por 2 horas e ressuspendida em 0,5 ml de PBS pH 7,4. A solução obtida foi adicionada a igual volume de Adjuvante Completo de Freund e administrado via intramuscular nas duas patas traseiras de um coelho. O sangue do animal foi colhido após três semanas, obtendo-se título de H.I. de 128. Neste mesmo dia uma suspensão de 0,3% de hemácias autólogas foi então inoculada via endovenosa no animal e, após sete dias, realizou-se nova colheita do soro do coelho. O título H.I. após a última colheita, utilizando-se oito unidades hemaglutinantes do vírus, era de 512.

Cortes de aproximadamente 5 μm foram obtidos a partir do material incluído em parafina e aderido a lâminas de vidro previamente tratadas com silano. Efetuou-se a desparafinização em banhos seguidos de xilol e etanol. A hidratação foi realizada através de banhos em concentrações decrescentes de etanol, seguindo-se a lavagem das lâminas em PBS (pH 7,4), por três vezes.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 30 volumes, por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas novamente em PBS (pH 7,4) por três vezes. Ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de soro de cabra 1:20 em PBS (pH 7,4).

O anticorpo primário policlonal de coelhos anti-OPMV (Homer et al., 1995) foi diluído na proporção de 1:500 em diluente composto por 12 ml de PBS (pH 7,4) acrescido de 0,25 ml de albumina bovina fração V e 0,5 ml de azida sódica. Os cortes foram então cobertos por esta solução foram incubados a 4ºC por 12 horas.

A reação foi completada com a utilização do Kit Strep ABComplex Duet HRP, Mouse Rabbit® (DakoCorporation, Carpinteria, C.A., EUA). O anticorpo secundário foi diluído na proporção de 1:100 em PBS (pH 7,4) e incubado por 1 hora à 37ºC, seguida de incubação em solução biotina-streptoavidina, utilizada na mesma condição anterior. Como cromógeno utilizou-se tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB®-DakoCorporation, Carpinteria, C.A., EUA), sendo a contra-coloração realizada com hematoxilina.

4.10 Pesquisa de agentes secundários

Amostras de sangue cardíaco colhidas assepticamente foram incubadas em caldo de Hemocultura Pediátrica® (Pró-Micro-São Paulo-Brasil) em estufa microbiológica a 37ºC por até 72 horas. O conteúdo foi então plaqueado em ágar sangue para o isolamento de possíveis colônias bacterianas.

Fragmentos de pulmão, fígado, baço, pâncreas, rim, adrenal e sistema nervoso central (SNC) foram colhidos assepticamente e macerados isoladamente em solução salina estéril. As amostras foram então semeadas em caldo de Infuso Cérebro e Coração (BHI) e em Placas de Ágar Sangue em duplicata, para incubação em condições de aerofilia e microaerofilia a 37ºC por até 72 horas. Posteriormente efetuou-se o plaqueamento das culturas provenientes do caldo BHI para o isolamento bacteriano.

Colônias bacterianas eventualmente isoladas foram submetidas à coloração Gram para análise morfológica e posteriormente identificadas pelo Sistema API® (Bio Mérieux, França).

Para o isolamento de fungos, todas as amostras foram semeadas em Ágar Sabouraud e incubadas em temperatura ambiente por até um mês.

4.11 Isolamento viral

Amostras de pulmão, fígado, baço, pâncreas, adrenal, SNC e de lavado traqueal foram utilizadas para o isolamento viral. Os fragmentos de órgãos foram macerados isoladamente em recipientes estéreis na proporção de 1,0 g de tecido para 1,0 ml de MEM suplementado com solução antibiótica (Penicilina G 100 U/ml e Estreptomicina 0,1 mg/ ml) e antifúngico (Anfotericina B 2,0 μg/ml). As amostras foram então clarificadas por centrifugação a 6.000 rpm por 30 minutos. Em seguida, inoculou-se tubos contendo monocamadas de VHC, sempre em triplicata, sendo que no primeiro tubo foram adicionados 0,1 ml da suspensão de órgãos, no segundo 0,2 ml e no terceiro 0,5 ml. O volume final dos tubos era de 1,0 ml, sendo este obtido pela complementação com MEM. As culturas foram mantidas em estufa a 28ºC e analisadas diariamente para observação de efeito citopático característico, por até 14 dias. O isolamento foi considerado negativo somente após a realização de três passagens em cultura celular sem a observação de efeito citopático característico. Todos os tubos foram congelados para posterior análise molecular.

4.12 Diagnóstico molecular por reação de transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

4.12.1 Extração de RNA viral

A extração do RNA viral foi baseada em protocolo proposto por Queiroz et al. (2001).

Fragmentos de pulmão, fígado, baço, pâncreas, adrenal, SNC e alíquotas de lavado traqueal foram utilizados para o diagnóstico viral por RT-PCR. A análise molecular foi realizada tanto no material direto, como após passagem em cultura celular. Neste caso utilizou-se a amostra de passagem considerada positiva, e no caso das negativas, a terceira passagem em cultura celular.

As amostras clarificadas foram submetidas a tratamento prévio para a eliminação de prováveis inibidores da reação. Quatrocentos μl da amostra foram misturados a 400 ml de Vertrel XF® (Du Pont Fluoroproducts, Wilmington, D.E., EUA), homogeneizados com auxílio do aparelho Vortex® e centrifugados em temperatura ambiente a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro microtubo e armazenado sob refrigeração (4ºC).

A extração do RNA viral foi realizada com o auxílio de Trizol Reagent® (Invitrogen Life Technologies, USA). Trezentos μl da amostra foram acrescidos a 900 μl de Trizol, homogeneizados com o auxílio da pipeta e deixados por 5 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se a adição de 240 μl de clorofórmio, agitação vigorosa e descanso por mais 10 minutos, também em temperatura ambiente. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, a fase superior incolor foi transferida para novo microtubo e adicionada a 600 μl de álcool isopropílico. Os tubos permaneceram por 10 minutos em temperatura ambiente

ou a 4ºC. Nova centrifugação a 12.000 rpm, a 4ºC por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante desprezado. O conteúdo restante, cerca de 100 μl, foi acrescentado a 900 μl de álcool etílico 75% e centrifugado a 9.500 rpm, a 4ºC por 5 minutos. O álcool foi então retirado cuidadosamente do tubo com auxílio de pipeta e o RNA em forma de filamentos foi deixado secar em temperatura ambiente. O RNA obtido foi ressuspendido em 20 μl de água Milli Q e utilizado para a reação de transcrição reversa (RT). Nos casos em que a reação não podia ser imediatamente realizada, as amostras foram armazenadas a –80ºC.

4.12.2 Reação de transcrição reversa (RT)

Os procedimentos utilizados para a reação de transcrição reversa foram baseados em protocolo previamente descrito (QUEIROZ et al., 2001).

Para a trancrição da fita simples de RNA em fita complementar de DNA (cDNA), uma alíquota de 20 μl do RNA extraído foi misturado ao tampão 5× RT *buffer*® (Invitrogen Life Technologies, EUA), 10mM de dNTP (dNTP Set, PCR grade®, Invitrogen Life Technologies, EUA), 10 U de inibidor de RNAse (RNase Inhibitor, cloned®, Life Technologies, EUA), 0,1 M de DTT (Invitrogen Life Technologies, EUA), 100 pmoles dos *primers* 1 e 2 conforme tabela 1 (AHNE et al., 1999), 2,5 ml de enzima MMLV-RT® (2,5 U-vírus da mieloblastose aviária-Invitrogen Life Technologies, EUA) e complementados a um volume final de 50 μl com água Milli Q. As amostras permaneceram 90 minutos a 37°C e 2 minutos a 95°C, para a inativação da enzima.

As fitas de cDNA foram imediatamente utilizadas como moldes na reação de amplificação gênica.

4.12.3 Reação de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação de PCR foi baseada em parâmetros descritos por Ahne et al. (1999).

Resumidamente, um volume de 5 μl da reação de síntese de cDNA foi transferido para um tubo Micro Amp®contendo a mistura de amplificação com as seguintes concentrações: 5 μl do cDNA, 100 ρM de *primers* 1 e 2, conforme tabela 1 (AHNE et al., 1999), 2,5 U de enzima enzima Biotools DNA polimerase ® (Biotools, BM Labs, Madrid, Espanha), 10 mM de dNTP® (Invitrogen Life Technologies, EUA) e 2,0 mM de $MgCl_{2.}$ Os reagentes foram complementados com água Milli Q para um volume final de 50 μl. A denaturação inicial das fitas de DNA foi realizada a 94ºC por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de denaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 50ºC por 30 segundos e extensão final a 72ºC por 2 minutos. As amostras que não apresentaram produtos na primeira amplificação foram submetidas a uma reamplificação.

O resultado final foi observado através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, submetido à voltagem de 100 volts e corado com solução de brometo de etídeo (5 μg/ml). A presença de bandas foi evidenciada por exposição à luz U.V.

4.13 Análise estatística

Os resultados obtidos nos exames de hemograma foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Friedman, adotando-se um grau de significância <0,5.

5. RESULTADOS

5.1 Clínica

Não foram observadas alterações clínicas ou comportamentais em qualquer animal. Todos apresentaram normorexia e normodipsia, sem manifestações de sinais clínicos de infecção pulmonar. Nenhum animal veio a óbito espontaneamente.

5.2 Exames hematológicos

Os resultados médios de hemograma por dia de colheita estão expressos na tabela 3. Os resultados de exames não especificados na tabela não foram realizados devido à pequena quantidade de sangue obtida durante a colheita correspondente.

A análise dos dados através do teste não paramétrico de Friedman não demonstrou haver diferença significativa entre os resultados obtidos.

Os resultados dos exames hematológicos de cada indivíduo encontram-se detalhados nos anexos 1 a 12.

Tabela 3 Distribuição de valores médios de exames hematológicos e respectivos erros padrão da média obtidos em relação ao dia de colheita após a inoculação do agente viral. São Paulo, 2001-2

Data	N	He ($x 10^6/mm^3$)	Leu ($/mm^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Tromb. ($/mm^3$)	Linf. (%)	Azur. (%)	Baso. (%)	Het. (%)
dia 0	12	487,00 ± 61,00	3,35 ±0,83	9,82 ±1,20	23,60 ±0,63	49,34 ±6,89	19,59 ±2,17	36,82 ±0,19	11,25 ±3,89	68,37 ±4,52	21,25 ±3,93	0,75 ±0,61	9,62 ±1,75
dia 3	10	376,00 ±35,28	3,00 ±0,74	8,22 ±0,73	22,77 ±1,79	63,96 ±3,85	2,31 ±1,58	36,71 ±1,56	5,35 ±0,91	58,00 ±8,70	30,77 ±8,98	0,11 ±0,11	11,33 ±2,01
dia 7	8	477,50 ±32,00	4,31 ±1,22	12,93 ±2,60	28,55 ±8,07	55,68 ±8,26	20,06 ±3,15	36,10 ±1,68	5,75 ±1,11	59,12 ±8,69	26,25 ±5,41	0,37 ±0,26	14,25 ±3,44
dia 14	6	448,00 ±33,67	5,20 ±2,10	8,30 ±0,31	30,60 ±3,14	69,88 ±9,13	18,83 ±1,20	28,00 ±2,29	9,00 ±2,28	61,66 ±8,64	22,16 ±5,09	1,33 ±0,88	14,83 ±4,22
dia 21	4	450,00 ±78,10	1,16 ±0,44	7,43 ±0,29	21,66 ±0,88	50,49 ±6,79	17,40 ±2,56	33,33 ±0,95	3,50 ±0,86	72,00 ±5,03	19,33 ±2,40	0,0	9,33 ±2,40
2 meses	2	275,00 ±15,00	3,00 0,00	6,50 ±2,00	24,50 ±4,50	88,46 ±11,53	23,30 ±6,00	25,80 ±3,30	3,00 ±0,50	79,00 ±11,00	19,00 ±11,00	0,00	2,00 0,00

n= número de animais avaliados, He= hemácias, Leu= leucócitos, Hb= hemoglobina, Ht= hematócrito, VCM= volume corpuscular médio, HCM= hemoglobina corpuscular média, CHCM= concentração hemoglobínica corpuscular média; Tromb= trombócitos, Linf= linfócitos, Azur= azurófilos, Baso= basófilos, Het= heterófilos

5.3 Resposta imune humoral

A reação de inibição de hemaglutinação apresentou título zero em todos os animais aos 3, 7, 14 e 21 dPI. Títulos de 128 e 256 foram obtidos nos animais nºs 10 e 11 (Grupo F), submetidos à eutanásia 2 mPI.

5.4 Necrópsia

O exame necroscópico não evidenciou lesões no animal nº1. O controle negativo posterior (nº 12) apresentou leve congestão pulmonar (fig. 1) e fígado com coloração pardo avermelhada associada ao arredondamento de bordos (fig.3).

Aos 3 dPI (Grupo B), ambos os animais (nºs 2 e 3) apresentaram discreta congestão pulmonar, observando-se também fígado com coloração parda no animal nº 2.

Aos 7 dPI (grupo C), o animal nº 4 apresentou intensa congestão e presença de conteúdo caseoso em pulmão esquerdo. Pequena quantidade de exsudato foi também observada em pulmão direito. O fígado exibiu aspecto estriado e coloração pálida, enquanto o coração apresentou espessamento de válvulas. Por sua vez, o outro animal (nº 5) exibiu congestão e espessamento de parede pulmonar, presença de pentastomídeo em saco aéreo, espessamento de parede esofágica e fígado de coloração parda.

Aos 14 dPI (grupo D), o animal nº 6 apresentou congestão pulmonar intensa e fígado com coloração amarelada (fig. 4). Por sua vez, no animal nº 7 foi observada congestão pulmonar (fig.2) intensa com aderência pericárdica em ápice cardíaco.

Aos 21 dPI (Grupo E), ambos os animais apresentaram espessamento e congestão de parede pulmonar, além de fígado com coloração pálida. Ainda, o animal nº 9 exibiu fígado de consistência firme, com resistência ao corte, enquanto no animal nº 8 foi observado baço com coloração esbranquiçada.

Aos 2 mPI (grupo F), os dois animais apresentaram acentuado espessamento de parede pulmonar, sendo que o animal nº11 também mostrou um discreto espessamento de saco aéreo e fígado com resistência ao corte.

5.5 Histopatologia

A relação dos animais, fragmentos de órgãos analisados e respectivas alterações microscópicas observadas estão demonstrados na tabela 4. A descrição dos resultados histopatológicos verificados em cada animal está abaixo sumarizada:

Animal nº 1 (Grupo A): discreta congestão em porção média pulmonar (fig.5); discretas congestão e degeneração vacuolar hepática (fig.11); esofagite discreta; glomeruloesclerose com fibrose glomerular discreta.

Animal nº 12 (grupo G): presença de moderada quantidade de larvas de nematóides, congestão e infiltrado mononuclear discretos em porção anterior de pulmão; discreta quantidade de larvas de nematóides, moderadas infiltração granulocítica e hiperplasia de epitélio em segmentos médio e posterior de pulmão; discreta quantidade de larvas de

nematóides em fígado, com moderada congestão, degeneração vacuolar e hemossiderose; nefrite focal discreta.

Animal nº 2 (Grupo B): discreta congestão e espessamento epitelial em porção anterior de pulmão, sem a presença de células inflamatórias (fig.6); moderada congestão, edema, antracose e hemossiderose discretos em porção média pulmonar; discreta congestão, edema e hiperplasia epitelial em porção pulmonar posterior; discreto edema celular e presença de células polimorfonucleares, moderada degeneração macro e microgoticular hepática; presença de grande quantidade de corpúsculos de Hassal em timo, com discreta presença de polimorfonucleares; histiocitose esplênica; gliose multifocal discreta e congestão discreta em SNC.

Animal nº 3 (Grupo B): edema septal e congestão moderada em porção anterior de pulmão com presença de grande quantidade de granulócitos e raros focos de hiperplasia epitelial - pneumonia intersticial aguda moderada; congestão, hiperplasia e hipertrofia epitelial moderada em região pulmonar média, discreta antracose - pneumonia intersticial aguda moderada; discreta quantidade de infiltrado granulocítico em região pulmonar posterior - pneumonia intersticial aguda discreta; moderada a severa esteatose e degeneração macro e microgoticular hepáticas, presença de aglomerados celulares (fig.12), com discreto infiltrado granulocítico; presença de grande quantidade de corpúsculos de Hassal em timo; discreta hiperplasia celular e congestão pancreática; esplenite granulocítica perifolicular com congestão moderada; fibrose renal multifocal discreta.

Animal nº 4 (Grupo C): congestão, hipertrofia e edema epitelial moderado em fragmento pulmonar anterior, com pequena presença de infiltrado granulocítico - pneumonia

intersticial subaguda moderada; moderada congestão, hiperplasia e hipertrofia epitelial em região pulmonar média, com presença de aglomerados de células mononucleares - pneumonia intersticial subaguda moderada; discreta hiperplasia e hipertrofia epitelial, moderada congestão em segmento de pulmão posterior - pneumonia intersticial subaguda discreta; presença de grande quantidade de granulomas caseosos em porção esquerda de pulmão - pneumonia piogranulomatosa severa (fig.20); degeneração macro e microgoticular hepática moderada, com discreta congestão; histiocitose e infiltrado granulocítico esplênica discretos; gliose nodular e difusa.

Animal nº 5 (Grupo C): presença de moderada quantidade de infiltrado granulocítico em luz traqueal - traqueíte aguda difusa; hiperplasia e hipertrofia epitelial, congestão e infiltração granulocítica pulmonar moderada, porção anterior - pneumonia intersticial multifocal aguda (fig.7); congestão discreta e presença de moderada quantidade de infiltrado granulocítico em porção pulmonar média - pneumonia intersticial aguda moderada; moderada hiperplasia e hipertrofia epitelial em segmento pulmonar posterior - pneumonia intersticial aguda moderada; discreta leucocitose e degeneração macro e microgoticular hepática; histiocitose esplênica moderada, com raro infiltrado granulocítico - esplenite aguda multifocal moderada; presença de moderada quantidade de corpúsculos de Hassal em timo; discreta formação de aglomerados celulares em pâncreas; gliose difusa (fig.14).

Animal nº 6 (Grupo D): discreta congestão, presença de discreta quantidade de infiltrado granulocítico em porção anterior de pulmão - pneumonia intersticial granulocítica discreta a moderada (fig.8); discreta hiperplasia e hipertrofia epitelial, congestão e infiltração granulocítica discretas, presença de aglomerados mononucleares (fig.10), necrose multifocal em pulmão médio - pneumonia intersticial subaguda; hiperplasia e hipertrofia epitelial,

congestão discreta e necrose multifocal em fragmento posterior de pulmão em quadro semelhante ao anterior; hepatite necrótica multifocal, degeneração macro e microgoticular severa, congestão moderada, discreta formação de aglomerados celulares; presença de grande quantidade de corpúsculos de Hassal em timo; histiocitose esplênica moderada; esofagite focal discreta; gliose focal e congestão discreta em SNC.

Animal nº 7 (Grupo D): hiperplasia e hipertrofia epitelial moderadas, presença de agregados de células mononucleares e fibroblastos em porção pulmonar anterior - pneumonia intersticial subaguda moderada; hemossiderose, hiperplasia e hipertrofia epitelial, congestão moderada com derrame multifocal de granulócitos em luz alveoloar em pulmão médio - pneumonia intersticial subaguda moderada; hiperplasia e hipertrofia epitelial moderada, congestão e infiltrado inflamatório discretos em pulmão posterior - pneumonia subaguda discreta; degeneração hepática macro e microgoticular moderada com congestão moderada e necrose focal discreta; histiocitose esplênica moderada com discretas hipoplasia e infiltrado granulocítico perifolicular; grande quantidade de corpúsculos de Hassal - involução tímica marcante; presença de aglomerados celulares em pâncreas (fig.13) presença de grande quantidade de células multinucleadas em pâncreas; congestão discreta e gliose em SNC

Animal nº 8 (Grupo E): hiperplasia e hipertrofia epitelial moderada a severa, moderada formação de sincícios em porção anterior de pulmão - pneumonia subaguda multifocal coalescente moderada a severa; moderada formação de sincícios, moderada quantidade de infiltrado inflamatório em pulmão médio - pneumonia subaguda multifocal moderada; discreta formação de sincícios e congestão moderada em pulmão posterior; discreto infiltrado granulocítico em traquéia; presença de áreas de necrose em miocárdio - miocardite multifocal crônica; degeneração macro e microgoticular discreta, edema celular,

hiperplasia ductal multifocal, infiltrado mononuclear, hemossiderose discreta - hepatite crônica multifocal discreta; histiocitose esplênica com hiperplasia linfocitária associada a ninhos de depleção linfóide

Animal nº 9 (Grupo E): presença de pequena quantidade de larvas de parasitas, discretos infiltrado inflamatório, edema e espessamento septal em pulmão anterior - pneumonia intersticial aguda discreta; hiperplasia e hipertrofia epitelial e congestão moderadas, discreto infiltrado mononuclear em pulmão médio - pneumonia intersticial subaguda discreta; hiperplasia e hipertrofia epitelial moderada, formação de sincícios, moderado infiltrado mono e polimorfonuclear, apoptose epitelial focal em fragmento posterior de pulmão - pneumonia intersticial subaguda severa; discreto infiltrado granulocítico em traquéia - traqueíte difusa discreta; degeneração macro e microgoticular moderada, necrose hepática focal; histiocitose e hipoplasia linfóide esplênica moderada, infiltração granulocítica perifolicular (fig. 15); gliose difusa em SNC.

Animal nº 10 (Grupo F): hiperplasia e hipertrofia epitelial marcantes com formação de sincícios em pulmão anterior - pneumonia intersticial crônica moderada; discreta hiperplasia e hipertrofia epitelial com formação de sincícios em pulmões médio e posterior - pneumonia intersticial crônica discreta; degeneração hepática macro e microgoticular, congestão e hiperplasia ductal discretas - hepatite necrótica multifocal discreta; discreta congestão pancreática; em baço, depleção linfóide, histiocitose e infiltrado granulocítico perifolicular severos; discreta quantidade de corpúsculos de Hassal em timo; calcificação focal em miocárdio; gliose focal em SNC.

Animal nº 11 (Grupo F): hiperplasia e hipertrofia epitelial discretas, com discreta formação de sincícios em porções anterior, média e posterior de pulmão - pneumonia intersticial subaguda discreta (fig.9); congestão e hiperplasia ductal hepática discreta, degeneração macro e microgoticular moderadas; discreto infiltrado granulocítico em baço; discreta quantidade de corpúsculos de Hassal em timo; degeneração vacuolar renal discreta.

Tabela 4 Distribuição das principais lesões microscópicas observadas, em função dos órgãos acometidos. São Paulo, 2001-2.

	Pulm. A	Pulm. M	Pulm. C.	Traquéia	Fígado	Baço	Pâncreas	Rim	timo	SNC
Congestão	2, 3, 4, 5, 6, 9	2, 3, 4, 5	2, 4, 6, 7			3	3, 6, 10			6, 7
Infiltrado granulocítico	3, 4, 5, 6, 7, 9	2, 3, 4, 5, 6, 7	2,3, 9	8, 9	3, 5	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11				
Hemossiderose	2	2, 7								
Antracose	2, 3, 4	2, 3	2, 3							
Hiperplasia e hipertrofia	4, 5, 7, 9, 10, 11	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	4, 5, 6, 7, 9, 10, 11							
Infiltrado mononucleares	7, 9	4, 6, 9	9				3, 6	5		
Edema	2, 3, 4	2,3	2		2, 8					
Deg.macro e microgoticular					2, 3, 5, 6 7, 8, 9, 10, 11					
Depleção linfóide						10				
Histiocitose						2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10				

Os números indicam os animais do experimento. Pulmão A.= pulmão anterior; Pulmão M.= pulmão médio; Pulmão P.= pulmão posterior

Tabela 4 Distribuição das principais lesões microscópicas observadas, em função dos órgãos acometidos. São Paulo, 2001-2.

Cconclusão

	Pulm. A	Pulm. M	Pulm. C.	Traquéia	Fígado	Baço	Pâncreas	Rim	timo	SNC
Sincícios	8	8,10, 11	8, 10		6	7	8			
Hipoplasia lifóide										
Hiperplasia linfóide										
Gliose nodular										2, 4, 5, 6, 10
Gliose difusa										4, 7, 9
Fibrose								3		
Involução (corpúsculos de Hassal)									2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	
Necrose focal	6	6	6, 11		9					
Hiper. ductal				8						
Larvas de parasitos	9, 12	9, 12	9, 12	12						
Apoptose			9							
Miocardite focal										

Os números indicam os animais do experimento. Pulmão A.= pulmão anterior; Pulmão M.= pulmão médio; Pulmão P.= pulmão posterior

5.6 Imunoistoquímica

À análise imunoistoquímica, pulmão, fígado, baço e pâncreas de todos os animais dos grupos B, C, D e E reagiram positivamente (fig. 16 e 17). Nos animais dos grupos B, C e D, a marcação em epitélio pulmonar mostrou padrão multifocal (fig.18), enquanto no grupo E observou-se um padrão linear (fig.19). Todos os órgãos dos animais do grupo F (2 mPI) e dos grupos controle (Grupos A e G) foram negativos nos ensaios imunoistoquímicos.

5.7 Pesquisa de agentes secundários

Colônias puras de *Xanthomonas maltophila*, identificadas pelo Sistema API 20 E, foram obtidas a partir de macerado de pulmão do animal nº 4 (Grupo C). Todos os outros cultivos destinados ao isolamento de possíveis agentes bacterianos e fúngicos foram negativos.

5.8 Isolamento viral

Não houve isolamento de partículas virais a partir do material colhido dos animais nºs 1 e 12 (Grupos A e G).

O isolamento foi positivo a partir de pulmão e fígado de todos os animais dos grupos B a E (3 a 21 dPI), e negativos nos animais nºs 10 e 11 (Grupo F). Sincícios característicos foram observados a partir de cultura de macerado de baço nos animais nºs 3, 4, 5, 6, 7 e 9, sendo que no nº 8 não foi realizada colheita deste material. Nas culturas celulares inoculadas com fluido de pâncreas, a formação de sincícios foi observada nos animais nºs 2, 3, 4, 5 e 10. Efeitos citopáticos não característicos estiveram presentes nos animais nºs 6 e 7, e ausentes no Grupo F. Todos os resultados foram negativos a partir de glândula adrenal. Em SNC foi observada a presença de sincícios característicos nos animais nºs 4 e 5 (7dPI) e presença de efeito citopático não característico nos indivíduos nºs 2, 3, 6 e 7.

Exames de isolamento viral a partir de lavado traqueal foram positivos em todos os animais inoculados do 3º ao 21º dPI (fig.22) e negativos aos 2 m PI .

5.9 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular do vírus pela técnica de RT-PCR foi positivo a partir de lavado traqueal direto do animal nº 8 e em macerado de pulmão dos animais nº 4 e 8.

A confirmação da presença do vírus por RT-PCR nos fluidos de cultura celular obtidos após a inoculação do macerado de órgão foi positiva em: lavado traqueal dos animais nºs 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 (fig.23); pulmão dos nºs 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9; fígado do nºs 2, 3, 4, 6 e 9; baço nos nºs 5 e 6; pâncreas nos nºs 3, 4, 5 e 8; SNC nos nº 4 e 5.

Os resultados de cultura celular e confirmação de diagnóstico molecular de lavado traqueal, distribuídos em função dos animais e dias de colheita estão expressos na tabela 5. Na

tabela 6 estão expressos os resultados de cultura e confirmação da presença do vírus nos fluidos de cultura por diagnóstico molecular , distribuídos em função dos animais.

Tabela 5 Distribuição de resultados de isolamento viral e RT-PCR a partir de fluido de cultura de lavados traqueais de *Boa constrictor* experimentalmente inoculadas com OPMV. São Paulo, 2001-2

animal	0 dia		3 dias		7 dias		14 dias		21 dias		60 dias	
	I	PCR	I	PCR	I	PCR	I	PCR	I	PCR	I	PCR
1	-	-										
2	-	-	+	+								
3	-	-	+	+								
4	-	-	+	+	+	-						
5	-	-	+	+	+	-						
6	-	-	+	+	+	-	+	+				
7	-	-	+	+	+	+	+	+				
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	-	-	NR	NR	+	+	+	+	+	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NR= não realizado; I= isolamento viral; PCR= confirmação da presença do vírus por diagnóstico molecular

Tabela 6 Distribuição dos resultados de isolamento viral em cultura celular e de RT-PCR a partir de fluido de cultura celular em relação ao animal. São Paulo, 2001-2

animal		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pulmão	I	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
	PCR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fígado	I	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
	PCR	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Baço	I	–	–	+	+	+	+	+	NR	+	–	–	–
	PCR	-	-	-	-	+	+	-		-	-	-	-
Pâncreas	I	–	+	+	+	+	?	?	–	+	–	–	–
	PCR	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Adrenal	I	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–
	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNC	I	–	?	?	+	+	?	?	–	?	–	–	–
	PCR	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = positivo; **-**= negativo; **?** = suspeito; NR= não realizado;I= isolamento viral; PCR= diagnóstico molecular

Fig. 1 Fotografia de corte longitudinal de pulmão de animal controle nº 12. Notar o padrão macroscópico normal do órgão

Fig. 2 Fotografia de corte longitudinal de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verificar a presença de grande quantidade conteúdo seroso espumoso. Animal nº 07, grupo D, 14 dPI

Fig. 3 Fotografia de corte longitudinal de fígado de animal controle. Observar o discreto aumento de volume do órgão, caracterizado pelo arredondamento de bordos. Animal nº 12, grupo G

Fig. 4 Corte longitudinal de fígado de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar coloração amarelada e arredondamento de bordos. Animal nº 06, grupo D, 14 dPI

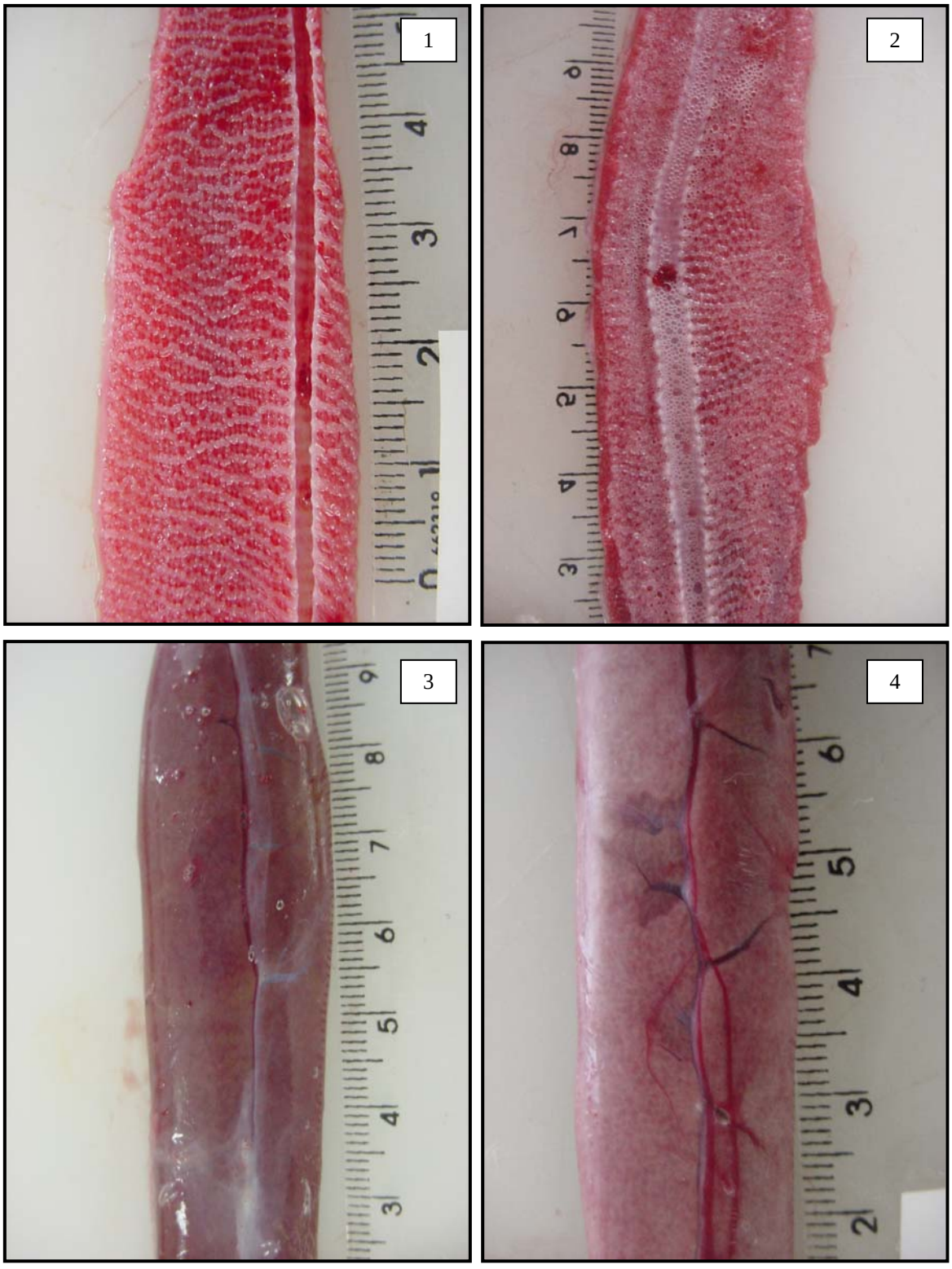

1
2
3
4

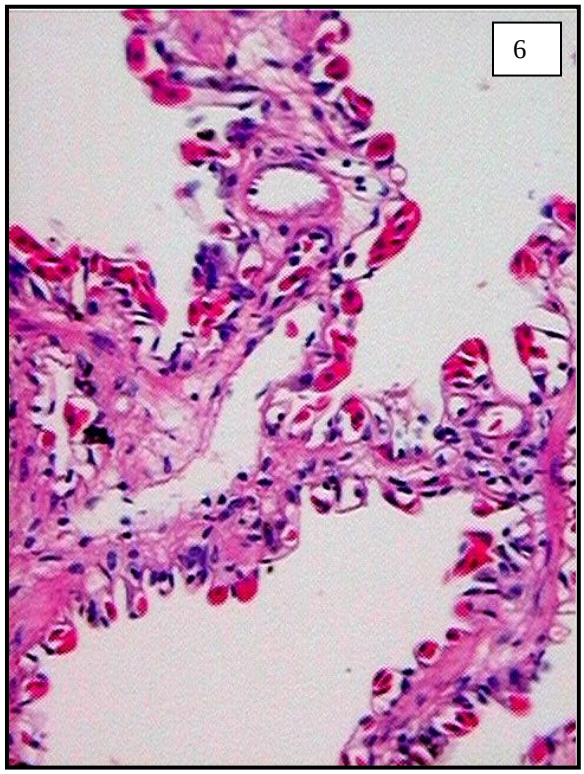
Fig. 5 Fotomicrografia de pulmão de animal controle. Notar a regularidade da arquitetura pulmonar. Animal nº 01, grupo A. HE. 400X

Fig.6 Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Observar a presença de congestão e hiperplasia epitelial. Animal nº 02, grupo B, 3 dPI. HE. 200X

Fig. 7 Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Hiperplasia e hipertrofia epitelial (seta) associada a infiltrado granulocítico. Animal nº 05, grupo C, 7 dPI. HE. 400X

Fig. 8 Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Notar intensa hiperplasia e hipertrofia epitelial (seta). Animal nº 06, grupo C, 14 dPI. HE. 200X

5


6

7

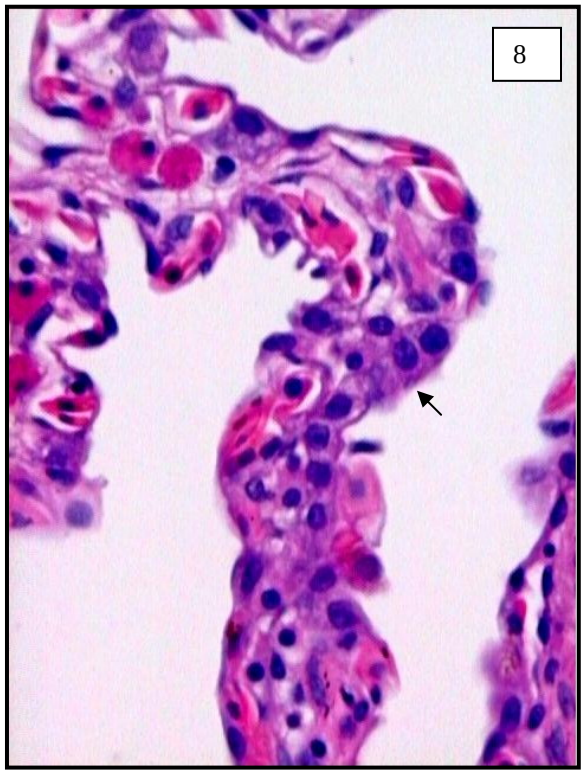
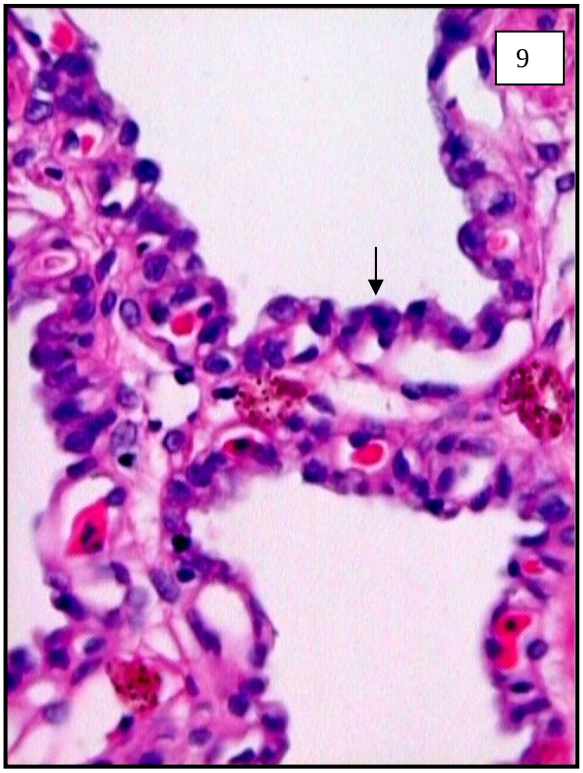

8

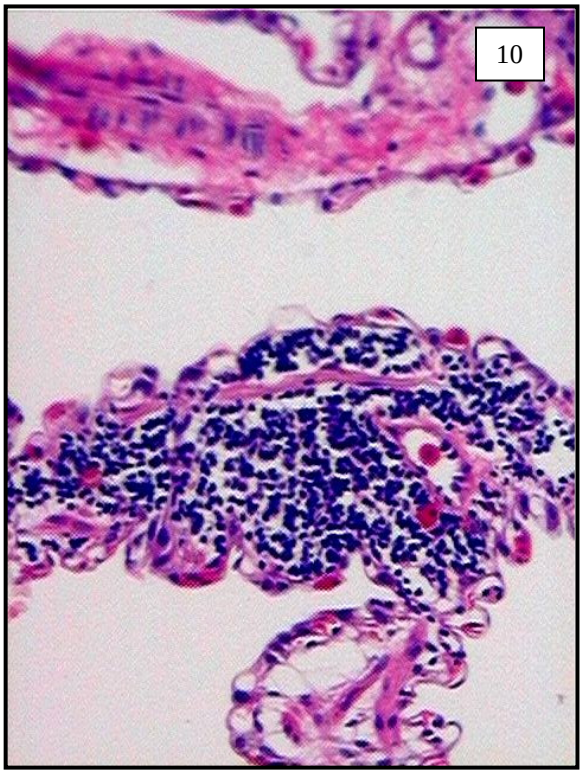
Fig. 9 Fotomicrografia de pulmão experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a persistência de hiperplasia e hipertrofia epitelial (seta), com presença de granulócitos. Animal nº 11, grupo F, 2 mPI. HE. 400X

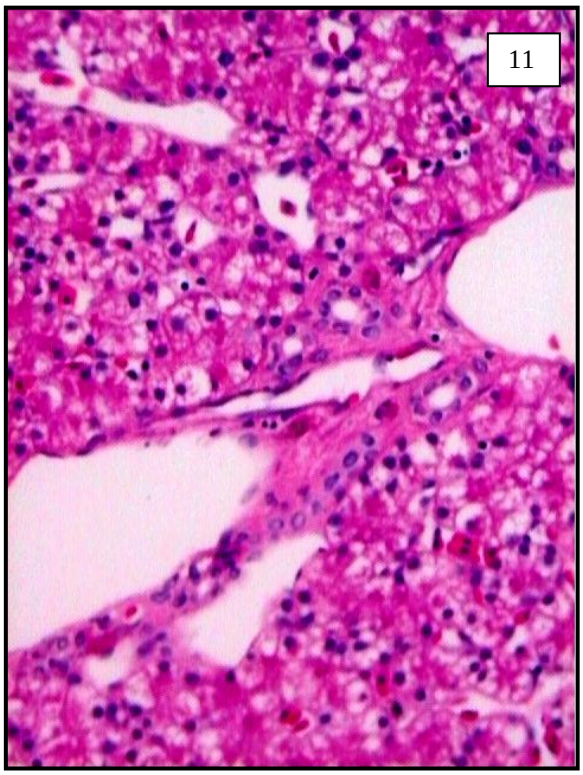
Fig. 10 Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Presença de ninhos de células mononucleares. Animal nº 06, grupo C, 14 dPI. HE. 200X

Fig. 11 Fotomicrografia de fígado de animal controle. Verifique a presença de degeneração gordurosa goticular. Animal nº 01, grupo A. HE. 400X

Fig. 12 Fotomicrografia de fígado de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Observar a presença de aglomerados celulares (seta). Animal nº 03, grupo B, 3 dPI. HE. 400X


9


10


11

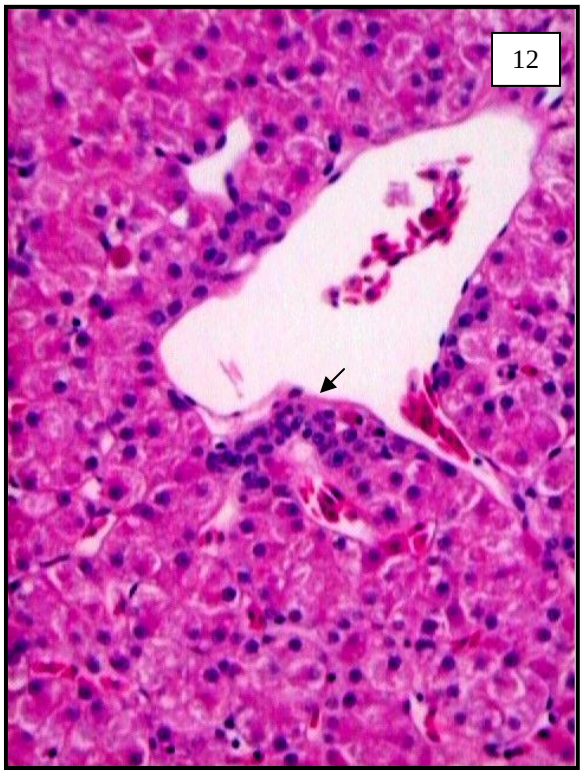
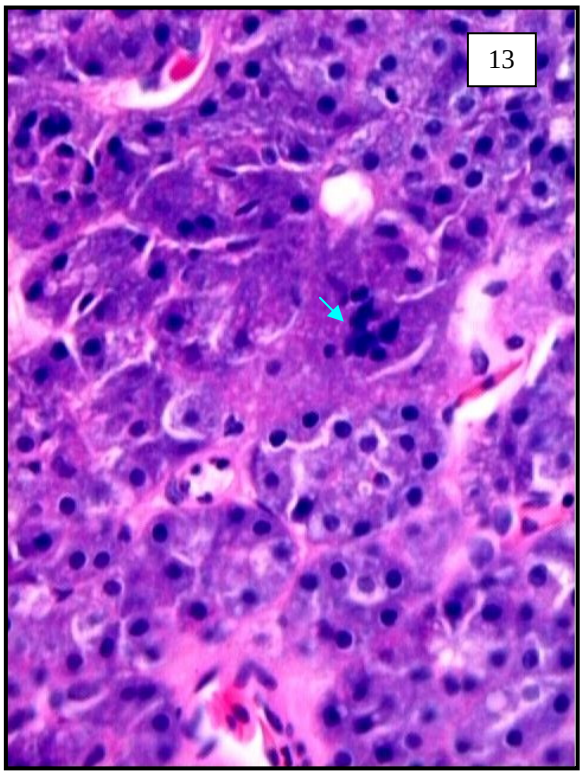
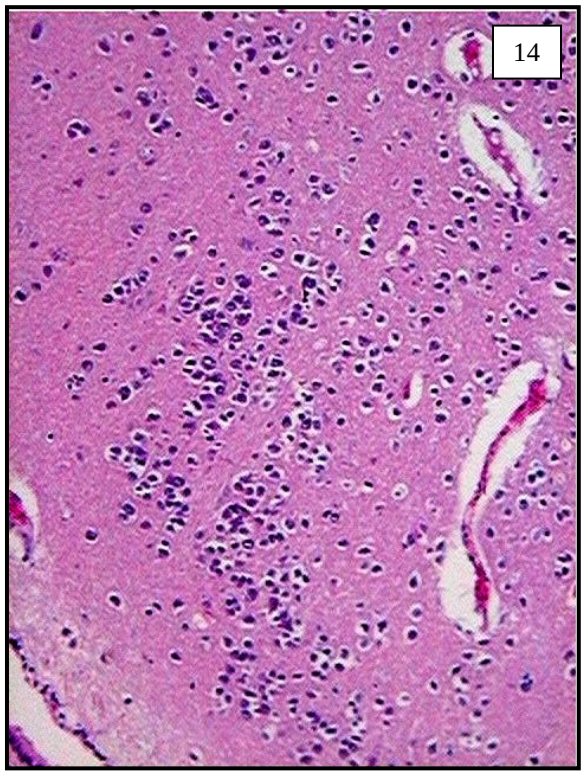

12

Fig. 13 Fotomicrografia de pâncreas de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a presença de aglomerados celulares (seta). Animal nº 07, grupo D 14 dPI. HE. 400X

Fig. 14 Fotomicrografia de SNC de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verifique a presença de gliose difusa. Animal nº 05, grupo C, 7 dPI. HE. 100X

Fig. 15 Fotomicrografia de baço de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar o padrão perifolicular de infiltração granulocítica. Animal nº 09, grupo E, 21 dPI. HE. 100X


13


14

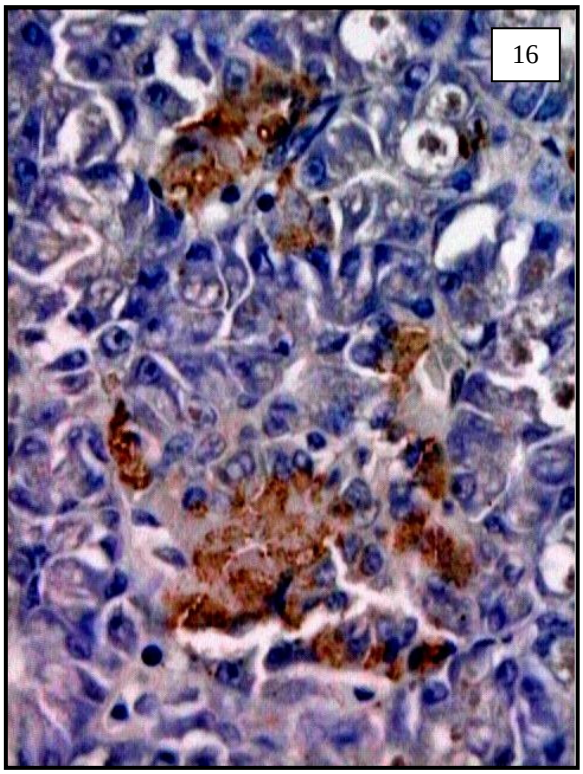
15

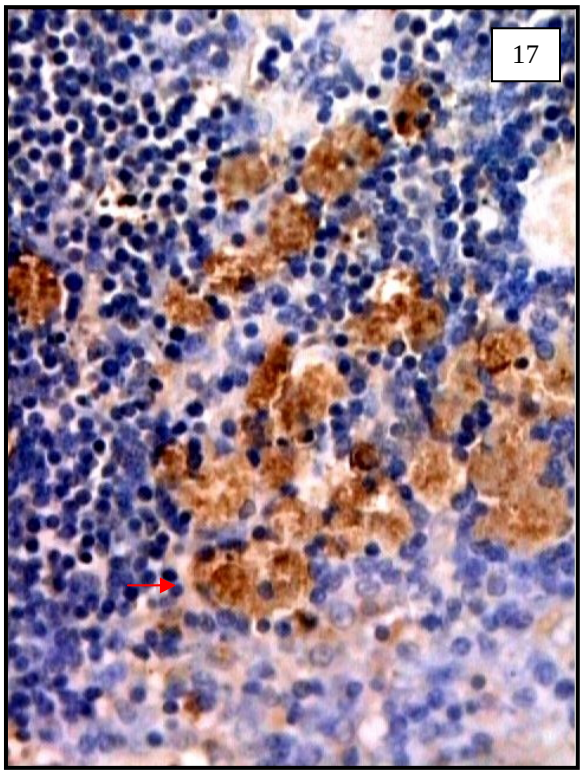
Fig.16 Fotomicrografia de pâncreas de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a intensa marcação imunoistoquímica (seta). Animal nº 07. grupo D, 14 dPI. ABC. 400X

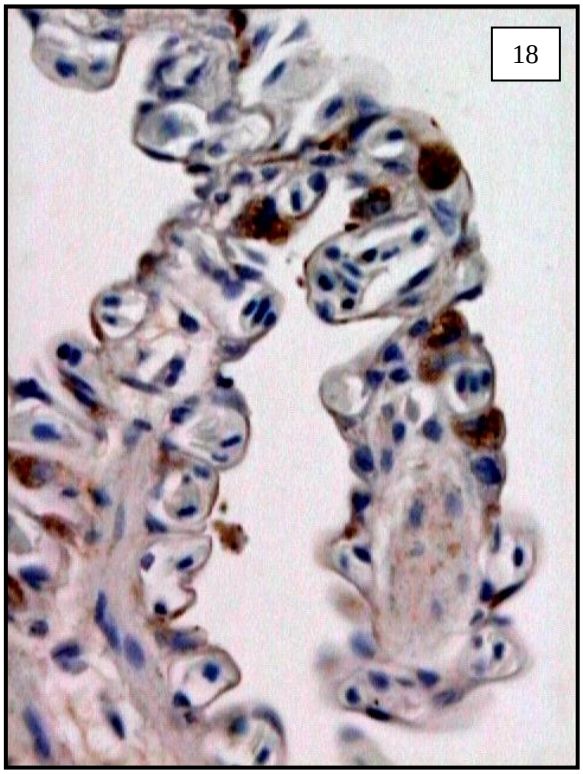
Fig.17 Fotomicrografia de baço de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Observe a intensa marcação imunoistoquímica (seta). Animal nº 06, grupo D, 14 dPI. ABC. 400X

Fig.18 Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Notar a marcação multifocal. Animal nº 06, grupo D, 14 dPI. ABC. 400X

Fig.19 Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Verifique a intensa marcação epitelial linear. Animal nº 09, grupo E, 21 dPI. ABC. 100X


16


17


18

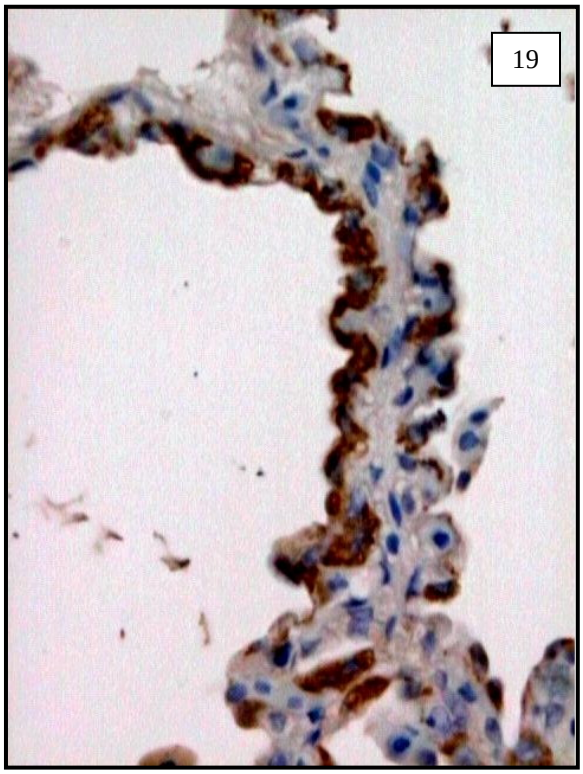
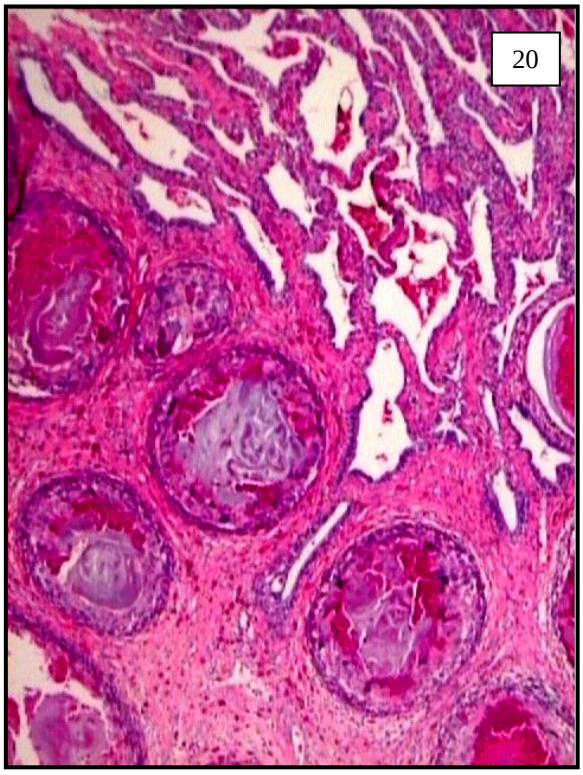

19

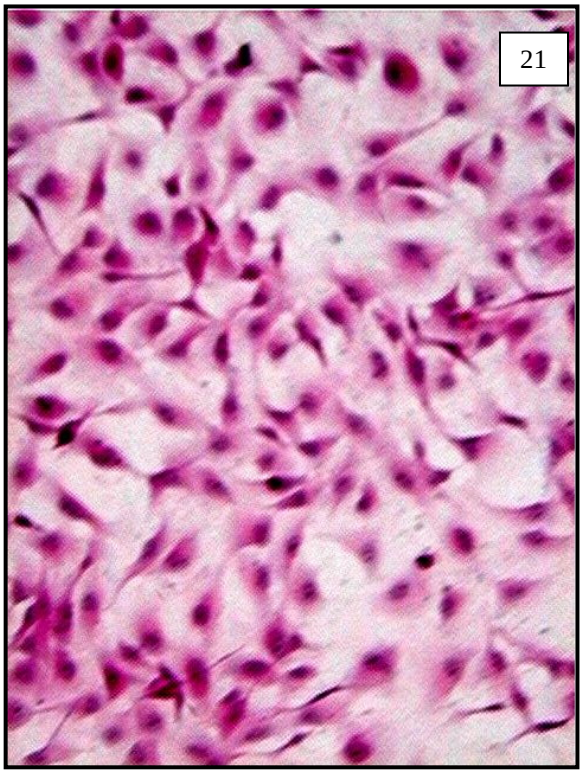
Fig. 20 Fotomicrografia de pulmão de animal experimentalmente inoculado com OPMV. Pneumonia piogranulomatosa severa. Animal nº 04, grupo C, 07 dPI HE. 200X

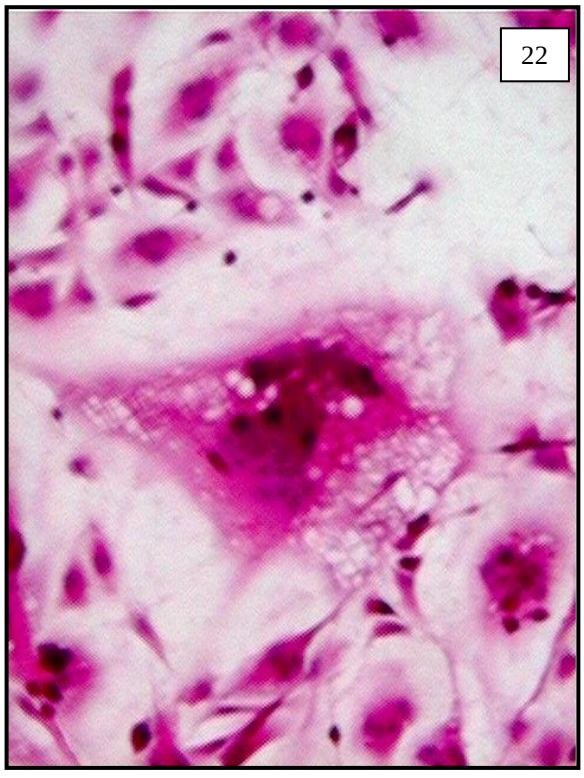
Fig.21 Fotomicrografia de monocamadas de VHC. HE. 5X

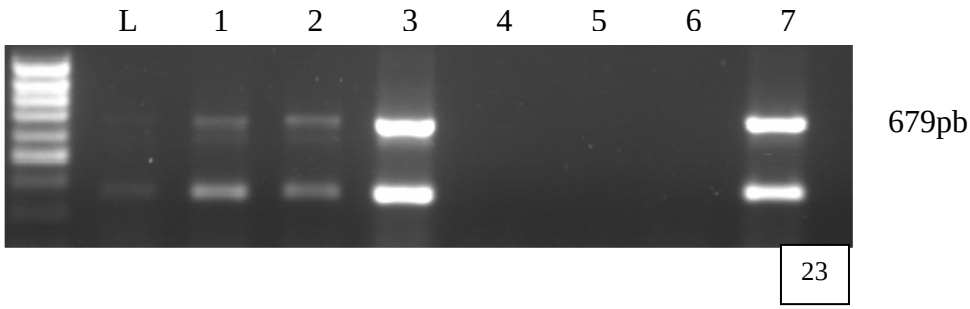
Fig.22 Fotomicrografia de cultura celular de VHC inoculada com fluído de lavado traqueal colhido aos 7dPI. Notar formação de sincício. Animal nº 5. HE. 10X

Fig.23 Resultados de RT- PCR realizado à partir lavado traqueal após passagem em cultura celular. Linhas 1,2, 3 e 4: animais 8, 9, 10 e 11 aos 21 d PI. Linhas 5, 6, 7: animais 10, 11 e 12 aos 2 m PI. (+) controle positivo


20


21


22


L
1
2
3
4
5
6
7
679pb
23

6 DISCUSSÃO

Apesar de ser considerado um dos principais patógenos que acometem as serpentes, muito pouco se sabe sobre o real papel desempenhado pelo OPMV em populações de boídeos, em especial em *Boa constrictor*, sendo raros os relatos de enfermidades naturais neste grupo de ofídios. Particularmente, muito pouco se conhece sobre a patogenia da infecção e o possível papel desempenhado pelos boídeos na cadeia epidemiológica da paramixovirose das serpentes. Dessa forma, o objetivo principal do presente trabalho foi contribuir para a compreensão da patogenia do OPMV neste grupo de répteis.

Relatos sobre enfermidades naturais na família Boidae em vida livre são inexistentes e raras são as descrições de doença em cativeiro. O isolamento de OPMV a partir de um exemplar morto de *Boa constrictor* já foi relatado (JACOBSON, 2003-comunicação pessoal), mas estudos sobre a infectividade e patogenicidade são desconhecidos. Para o nosso trabalho, foi escolhida esta espécie devido à disponibilidade de animais e à possibilidade de fornecimento de informações importantes sobre a infecção por OPMV. A ausência de relatos sobre epizootias nesta espécie demonstra a possibilidade desta servir de reservatório para o OPMV. Até o momento da realização dos experimentos, não se tinha conhecimento de isolados de OPMV provenientes de jibóias. Desta forma, optamos por empregar como antígeno uma amostra de OPMV proveniente de “Aruba Island Rattlesnake”, uma vez que tal amostra já havia sido usada em experimento anterior (JACOBSON et al., 1997).

No presente experimento não houve manifestação clínica em nenhum dos animais. Em relatos anteriores foram observados distúrbios posturais, regurgitação, anorexia, fezes mucosas, tremor de cabeça e convulsão terminal (JACOBSON, et al., 1981; JACOBSON, et al., 1992; POTGIETER et al., 1987), sendo, porém, comum também o óbito sem a observação

destes sinais. Estudos experimentais prévios em “Aruba Island Rattlesnake” demonstraram que o primeiro óbito ocorrera aos 19 dPI e o último aos 21 dPI (JACOBSON, et al., 1997). Nosso trabalho monitorou os animais até 60 dPI com o intuito de verificar a sobrevivência das serpentes e o possível papel destas como reservatório do vírus. A soroconversão observada aos 2 mPI, indicou o sucesso da infecção experimental.

No presente estudo nenhum animal apresentou óbito espontâneo e apenas aos 2 mPI houve soroconversão. Devido a não ocorrência de morte espontânea nos grupos experimentais, nossos resultados permitem sugerir que haveria uma maior sobrevida nos animais inoculados. Dados não publicados revelam que serpentes *Boa constrictor* sobrevivem até ao menos um ano PI, sem a manifestação de sinais clínicos (KOLESNIKOVAS et al., comunicação pessoal).

O sucesso da infecção viral está intimamente relacionada a fatores intrínsecos do hospedeiro, sendo que um mesmo patógeno pode determinar desde doença clinicamente assintomática até a morte. Dentre estes fatores podemos citar: estado imune, determinantes genéticos, idade, estado hormonal, hábitos individuais, padrão de resposta inflamatória e fatores enzimáticos (TYLER; FIELDS, 1996). Os animais utilizados no estudo possuíam peso e idade semelhantes, mesma procedência e foram distribuídos aleatoriamente em relação à variável sexo. Portanto, acreditamos que uma provável influência determinada por estes fatores possa ter sido amenizada frente aos cuidados de aclimatação tomados. Não foram observadas alterações clínicas em nenhum dos indivíduos do experimento, e em apenas um animal (nº 4) o exame “post-morten” demonstrou um padrão atípico de lesão pulmonar caracterizado por pneumonia piogranulomatosa.

A localização, ou tropismo, e extensão da lesão provocada pelo vírus está correlacionada à viabilidade dos receptores celulares, à especificidade da proteína viral de adesão, a sítios de clivagem de proteases virais e a sítios de ligação celular. Muitas vezes, em

determinados órgãos, ocorre apenas a infecção de discretas populações celulares (TYLER; FIELDS, 1996). A positividade dos exames imunoistoquímicos em pulmão, fígado, pâncreas, baço e timo dos animais estudados demonstrou a distribuição do agente viral e colonização destes órgãos a partir do terceiro dPI e conseqüente afinidade entre estes tecidos e o vírus. O padrão linear de marcação imunoistoquímica em células epiteliais pulmonares, observado nos animais n^{os} 8 e 9 aos 21 dPI, sugere um forte tropismo entre a célula epitelial pulmonar e o OPMV.

A magnitude e persistência da virose depende da relação da quantidade de vírus que invade o organismo e a eficiência como ele é eliminado. O organismo possui mecanismos não imunogênicos de eliminação viral, como movimento ciliar e presença de interferons, entre outros. A resposta imune ao vírus e/ou ao conjunto célula-vírus representa o mecanismo do organismo animal de reconhecer e eliminar o agente invasor, assim como as células infectadas (WHITTON; OLDSTONE, 1996). Animais submetidos a vacinação com OPMV inativados respondem positivamente após 42 a 63 dias da imunização, com título persistente até ao menos 296 dPI (JACOBSON et al., 1991). Semelhantemente, a soroconversão dos animais do experimento foi detectada apenas após 8 semanas PI, confirmando os dados previamente descritos. O conjunto de resultados imunoistoquímicos, de isolamento e diagnóstico molecular negativos, associados à sorologia positiva aos 2 mPI, levam-nos a acreditar na eficiência do sistema imune dos animais em eliminar o agente invasor.

A disseminação do vírus pelo organismo, determinando uma situação de infecção sistêmica, depende da superfície do epitélio pela qual este se propaga. Se a propagação ocorrer para a superfície luminal, a infecção será localizada; se por outro lado, o vírus for propagado para a região estromal, haverá tendência a generalização da doença (TYLER; FIELDS, 1996). O isolamento em cultura celular, confirmado pelo diagnóstico molecular positivo para o OPMV a partir de lavados traqueais, dos três aos 21 dPI, demonstrou a

eliminação de partículas virais para a superfície luminal do órgão e conseqüente possibilidade de transmissão por via aerógena da doença. Por outro lado, nos animais dos grupos B, C, D e E (3,7,14 e21 dPI, respectivamente) a presença do vírus também foi demonstrada em fígado, pâncreas, baço e SNC, não necessariamente em todas as serpentes. Desta forma, estes resultados levam-nos a acreditar na propagação do vírus também para a região estromal pulmonar, com conseqüente disseminação do agente pelo organismo.

Alguns vírus da família Paramyxoviridae, como os do sarampo e da cinomose, apresentam um padrão persistente de doença. Em relação à forma persistente do sarampo (SSP), é sabido que o vírus permanece em um estado quiescente no SNC, com replicação lenta e pequena expressão de antígenos na membrana celular. Dentre os Herpesviridae, o DNA de partículas virais latentes em gânglios sensoriais pode ser demonstrado por PCR e técnica de “Southern blot” (AHMED et al., 1996). Diante destas observações, associadas aos exames de cultura celular e RT-PCR negativos aos 2 mPI, poder-se-ia especular sobre a possibilidade do OPMV produzir padrão cronificado da doença nos Boídeos. Estudos complementares poderão responder esta pergunta.

Dentre os resultados obtidos em nosso trabalho, verificamos a ocorrência de infiltrado granulocítico no pulmão em todos os tempos experimentais. As células sangüíneas das serpentes podem ser classificadas em eritrócitos, trombócitos e leucócitos, sendo as últimas subdivididas em linfócitos, azurófilos, heterófilos e basófilos. Os linfócitos são os leucócitos de maior prevalência na maioria dos animais, estando correlacionados a processos inflamatórios e cicatriciais (CAMPBELL, 1996). Os heterófilos podem ser considerados células análogas aos neutrófilos dos mamíferos, tendo como função primária a fagocitose. Estas células participam da resposta inflamatória, tanto associadas a processos inespecíficos, tais como estresse e neoplasia, como em infecções microbianas e infestações parasitárias (CAMPBELL, 1996; SYPEK e BORYSENKO, 1988). Os azurófilos estão correlacionados a

processos inflamatórios de etiologia bacteriana, e os basófilos a infestações por hemoparasitas (ALLEMAN et al., 1999). Por outro lado, em processos inflamatórios crônicos o padrão lesional apresentado pelos répteis é a formação de granulomas (MONTALI, 1988). Estudos sobre a resposta inflamatória induzida por corpo estranho em *Boa constrictor* demonstraram que após 4 horas de implante de um fio de sutura há infiltração de heterófilos e macrófagos. A persistência destes tipos celulares foi observada aos 2, 7, 15, 69 e 117 dias após a indução inflamatória (TUCUNDUVA et al., 2001). Tendo em vista estas observações e considerando-se a ausência de isolamentos bacterianos ou fúngicos secundários em todos os animais experimentalmente inoculados, exceto no indivíduo nº 4, pode-se sugerir que nossos resultados devam-se à presença do vírus no organismo animal. A infiltração de heterófilos foi também observada em fígado, baço e pâncreas dos animais infectados. Porém, este padrão lesional nestes órgãos, não é relatado em literatura (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al.,1992).

O aumento de linfócitos circulantes está relacionado a processos inflamatórios, cicatrização de tecidos, infecções parasitárias ou virais (CAMPBELL, 1996). Por sua vez, os heterófilos podem ter seu número circulante aumentado em infecções por microorganismos, parasitas ou traumas. Este número também pode estar alterado em caso de estresse, neoplasia ou leucemia. (CAMPBELL, 1996). A comparação dos dados nos diversos tempos através do teste de Friedman demonstrou não haver diferença significativa entre os valores hematológicos obtidos antes e após a inoculação do vírus. Tal resultado pode estar correlacionado ao pequeno número de amostras utilizadas. Estudos futuros envolvendo um maior número de indivíduos poderão elucidar essa questão.

Os resultados morfológicos pulmonares obtidos no presente trabalho corroboram em grande parte aqueles descritos por Jacobson et al. (1997). Estes autores observaram, através de inoculação experimental de OPMV em *Crotalus adamanteus,* a ocorrência de infiltrado

granulocítico aos 4 dPI; hiperplasia epitelial, presença de debris celulares, hemácias, heterófilos, linfócitos e macrófagos aos 8 dPI; presença de células epiteliais cubóides, espessamento septal, edema e agregados de linfócitos, heterófilos e macrófagos aos 15 dPI; presença de corpúsculos intracitoplasmáticos e células epiteliais cubóides, necrose de coagulação e hemorragia aos 19 dPI; heterófilos degenerados, fibrina e eritrócitos aos 21 dPI. Com relação aos nossos dados, as principais diferenças observadas foram a hipertrofia e hiperplasia epiteliais reportadas já aos 3 dPI (animal nº 3); formação de agregados de células mononucleares aos 7 dPI (animais nºs 4 e 5); presença de infiltrado granulocítico, congestão, hiperplasia e hipertrofia epiteliais com formação de sincícios aos 21 dPI (animais nºs 8 e 9); ausência de inclusão intracitoplasmática em todos os animais.

Aos 2 mPI, as lesões observadas em nosso experimento caracterizaram-se por marcante hipertrofia e hiperplasia epiteliais, com raro infiltrado granulocítico, determinando um padrão morfológico de pneumonia crônica ou subaguda. Apesar de não haver um parâmetro comparativo estabelecido, uma vez que os trabalhos experimentais existentes envolvendo a inoculação de OPMV restringem-se aos 21 dias de investigação, acreditamos que os resultados obtidos representam a expectativa de evolução do processo em boídeos. Porém, estudos complementares com outras espécies de serpentes, em tempos e colheitas menos espaçados, poderão trazer informações mais consistentes sobre a patogenia do OPMV em serpentes.

As alterações pulmonares observadas ao exame microscópico no animal nº 12 (controle negativo posterior), isto é, infiltração granulocítica e hiperplasia epitelial, foram determinadas pela presença dos parasitas no órgão, valendo ressaltar os resultados negativos apresentados nos ensaios imunoistoquímicos e virológicos.

Uma observação realizado em todos os animais investigados em nosso trabalho foi a degeneração gordurosa hepática macro e microgoticular. De acordo com Contran et al.

(2000), em mamíferos este processo pode estar, dentre outras causas, diretamente relacionada ao estresse, devido a grande solicitação do órgão para o metabolismo de corticosteróides produzidos pela glândula adrenal. Em estudo realizado com serpentes *C. durissus*, 86,6% de animais, aparentemente sadios e recém doados, e 47,6% de animais doentes mantidos em cativeiro apresentavam este padrão lesional (KOLESNIKOVAS, 1997). Como este processo foi verificado em todos os nossos animais, inclusive nos indivíduos controle, sugerimos que este achado possa estar correlacionado ao estresse de manipulação e de manutenção em cativeiro, além da infecção viral nos grupos experimentais. Outras lesões hepáticas como necrose, congestão sinusoidal e aglomerados celulares já demonstrados anteriormente em infecções por OPMV (JACOBSON et al., 1992), foram ocasionalmente observadas.

Em relação ao pâncreas, as principais alterações descritas em serpentes infectadas por OPMV são necrose de coagulação multifocal, hiperplasia ductal e hiperplasia acinar (JACOBSON et al., 1992). Porém, tais processos não foram observados em nosso experimento, sendo que as lesões predominantemente relatadas foram congestão, formação de aglomerados celulares, presença de células multinucleadas e infiltração granulocítica, sendo que as alterações acima descritas não puderam ser correlacionadas ao tempo de inoculação. Os motivos da discrepância observada entre nossos resultados relativos ao pâncreas com aqueles descritos por Jacobson et al. (1991), podem ser de diversas ordens, tais como tempo de infecção ou espécie animal utilizada. Estudos complementares utilizando-se outros isolados virais, espécies animais e colheitas em tempos diversos devem ser realizados na tentativa de elucidar estes fatos.

Não há na literatura descrição de alterações esplênicas associadas ao OPMV (BLAHAK, 1995; JACOBSON et al., 1991; JACOBSON et al., 1992; JACOBSON et al., 1997; POTGIEGER, et al., 1987). Porém, em nosso trabalho a histiocitose e a esplenite granulocítica estiveram presentes em graus variados em todos os grupos inoculados. A

participação dos macrófagos nos mecanismos de defesa do hospedeiro são bem conhecidos. Em especial, os macrófagos esplênicos são consideradas as células mais ativas na fagocitose de bactérias e vírus circulantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Dessa forma, é lícito supor que a viremia ocorrida durante a infecção tenha promovido as alterações esplênicas verificadas. O padrão perifolicular de infiltrado granulocítico em baço foi observado nos animais n^{os} 3, 9 e 10. É sabido que em mamíferos a região perifolicular representa cerca de 8% da massa total do baço e que sua composição celular assemelha-se à do sangue periférico (HAN et al., 1997). As alterações observadas podem, portanto, estar relacionadas a um aumento de granulócitos circulantes.

No presente estudo não foram observadas lesões em trato gastrointestinal, sendo que na literatura são relatados, eventualmente, gastrite, colite ou enterite (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992). Alguns vírus da família Paramyxoviridae, dentre eles o vírus da cinomose canina e do sarampo, podem determinar alterações no trato gastrointestinal pela infecção direta do epitélio do órgão. A diarréia, porém, é freqüentemente associada a infecções secundárias por bactérias ou vírus (GRIFFIN et al., 1996). A infecção secundária por bactérias em animais acometidos por OPMV já foi descrita em literatura (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992). Algumas destas bactérias, tais como *Salmonella* sp, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, são conhecidamente enteropatogênicas em humanos (BRENNER, 1984; POPOFF, 1984). As causas para a não ocorrência de alterações gastrointestinais em nosso trabalho não puderam ser claramente definidas. Estudos complementares, envolvendo a infecção experimental de *B. Constrictor*, concomitante ou subseqüente, Poe OPMV e bactérias enteropatogênicas e/ou oportunistas poderão esclarecer estes pontos.

As lesões renais, caracterizadas por infiltrado mononuclear e fibrose vistas apenas nos animais n^{os} 3 e 5, foram interpretadas como ocasionais. A presença de necrose renal focal associada a bacilos, descrita por Jacobson et al. (1981), não foi observada em nossos animais.

As lesões microscópicas induzidas pelo OPMV no SNC descritas em trabalhos prévios são a degeneração neuronal, gliose, desmielinização e presença de corpúsculo intracitoplasmáticos em células da glia (JACOBSON et al., 1980; WEST et al., 2001). No presente estudo, as lesões predominantes em SNC foram glioses nodular (animais n^{os} 2, 4, 5, 6, 10) ou difusa (n^{os} 4, 7, 9), e congestão (n^{os} 6 e 9). Corpúsculos intracitoplasmáticos não foram observados em qualquer animal. A ausência de alterações nos animais controle, associada ao isolamento viral nos animais n^{os} 4 e 5, sugerem que as lesões observadas tenham sido causadas pela presença de partículas virais no tecido.

Um achado freqüentemente observado em nosso trabalho foi a ocorrência de sincícios e aglomerados celulares em múltiplos órgãos. A fusão celular, com conseqüente formação sincícios, em infecções por vírus da família Paramyxoviridae está diretamente relacionada às características da proteína estrutural de fusão F, subunidades F1 e F2 (LAMB e KOLAKOFSKY, 1996). A tendência à formação de aglomerados celulares e sincícios em órgãos como pulmão, fígado e pâncreas nos animais do presente estudo pode estar diretamente relacionada a esta característica da cepa viral utilizada.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são descritas como patógenos de plantas e eventuais causadores de doenças em animais (BRADBURRY, 1984). *X. maltophila* já foi descrita como agente secundário ao OPMV (JACOBSON et al., 1981) e associadas à dermatite vesicular em *Micrurus corallinus* (ZACARIOTTI et al., 2000). A ocorrência de infecções oportunistas em serpentes acometidas por OPMV é bem reconhecida na literatura (JACOBSON et al., 1981; JACOBSON et al., 1992). Em nosso trabalho, o animal n^{o} 4 exibiu pneumonia piogranulomatosa com isolamento de *X. maltophila*. Considerando o padrão

crônico da lesão, é possível sugerir que este animal apresentava um quadro infeccioso de etiologia bacteriana prévio, que foi agravado pela inoculação do OPMV.

Os resultados positivos para o RT-PCR em três amostras obtidas previamente à passagem em cultura celular, associados aos exames também positivos de isolamento em cultura celular e confirmação da presença do vírus por RT-PCR no fluido de cultura, reafirmam o diagnóstico imunoistoquímico. Os resultados positivos em pulmão demonstram a presença de infecção celular, proliferação e eliminação viral pelo epitélio do órgão devido aos fatores já citados. O isolamento com confirmação por diagnóstico molecular em fígado, baço, pâncreas e SNC nos Grupos B, C, D e E (3, 7, 14 e 21 dPI, respectivamente) ratificaram o tropismo e presença de receptores ao vírus nestes tecidos. Porém, os resultados negativos em alguns animais sugerem a possibilidade de ocorrência de padrões distintos de infecção, provavelmente devido a fatores individuais de cada animal (receptores, sítios de ligação e resposta imune).

O presença do OPMV em SNC já foi descrita anteriormente, com diagnóstico baseado em estudos ultraestruturais e microscópicos (WEST et al., 2001). Em nosso trabalho obtivemos isolamento com confirmação da presença do vírus por RT-PCR aos 7 dPI em SNC, sugerindo ser este o período no qual o antígeno está presente no sistema com capacidade de replicação. Após este período, o vírus foi provavelmente eliminado do SNC através da ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

A reamplificação, isto é, nova reação de PCR em produtos de uma amplificação anterior, foi realizada em todas as amostras negativas. Apesar da consistência dos resultados positivos de isolamento viral a partir de macerado de órgãos e lavados traqueais, as análises moleculares confirmaram estes resultados apenas após a passagem do material em cultivo celular. A presente observação sugere que a reação molecular adotada exibia baixa

sensibilidade analítica. Eventuais alterações no protocolo de RT-PCR devem ser realizados com o intuito de buscar graus de confiabilidade mais elevados para este procedimento.

Os resultados positivos, o isolamento com confirmação por diagnóstico molecular a partir dos lavados traqueais aos 3, 7, 14 e 21 dPI, levam-nos a acreditar que este procedimento (lavado traqueal com isolamento e confirmação molecular) pode ser utilizado em animais com suspeita de infecção aguda por OPMV. Neste caso, a grande vantagem deste método seria a rapidez para a obtenção dos resultados, quando comparado as 6 a 8 semanas necessárias para a utilização da técnica diagnóstica da soroconversão (JACOBSON, 1995).

O relato de doença por OPMV em boídeos é, em relação aos viperídeos, raro. Surtos observados em criações de serpentes demonstram que a susceptibilidade e a mortalidade nesta família são bastante reduzidas. No "Louisiania Purchase Gardens and Zoo" – EUA, 8% da população de viperídeos veio a óbito, não havendo descrição de morte de boídeos (JACOBSON et al., 1981); já no "Audubon Park and Zoological Garden- New Orleans- EUA", dentre 42 ofídeos que vieram a óbito, apenas dois pertenciam à Família Boidae (*B. constrictor occidentalis*, *C. caninus*), sendo que as lesões histopatológicas observadas nestes indivíduos não puderam ser associadas ao OPMV (JACOBSON et al., 1991). Mais recentemente, ocorreram relatos de paramixovirose em serpentes da família Pythonidae, onde o OPMV foi isolado a partir de biópsia pulmonar de um exemplar de *Phyton reticulatus* com histórico de secreção nasal e ruídos respiratórios (MANVELL et al., 2000). A paramixovirose foi também diagnosticada em um exemplar de *Morelia boeleni* a partir de fragmentos de cérebro submetidos a procedimentos ultraestruturais e hibridização "in situ" (WEST et al., 2001).

A baixa susceptibilidade dos boídeos ao OPMV pode depender de vários fatores. Estudos realizados com vírus da mesma família, como os Sendai Vírus e vírus da Doença de Newcastle, indicam que a localização e extensão das lesões provocadas dependem de fatores

como a viabilidade dos receptores para a adesão viral e a especificidade da proteína de adesão viral, da presença de proteases, de sítios de ligação celular, além de outros fatores virais não identificados (COLLINS et al., 1996). O “status” imune do hospedeiro também é considerado um fator importante na distribuição do vírus pelo organismo, sendo que estudos realizados com animais imunossuprimidos indicaram que há disseminação e infecção produtiva em diversos órgãos após inoculação experimental (COLLINS et al., 1996). Estudos complementares nos campos da virologia, imunopatologia, patologia, dentre outros, envolvendo a paramixovirose e as diversas famílias de serpentes poderão esclarecer estas e demais dúvidas existentes.

A ausência de sinais clínicos, associada a ocorrência de lesões em múltiplos órgãos e ao isolamento positivo com confirmação por RT-PCR nos animais deste estudo sugerem que as jibóias apresentam uma infecção clinicamente assintomática, porém com possibilidade de eliminação do agente por via aerógena até, ao menos, 21 dias após a inoculação. Estes animais representariam, portanto, uma importante fonte de infecção para os répteis, sendo essencial a adoção de normas estritas de controle sanitário dos plantéis estáveis, assim como de indivíduos recém adquiridos mantidos em quarentena.

7 CONCLUSÕES

- Apesar de não haver manifestação clínica ou óbito espontâneo de qualquer animal, os resultados morfológicos, sorológicos e moleculares mostram que há replicação viral com desenvolvimento de lesões em múltiplos órgãos e soroconversão em animais experimentalmente inoculados. Tais resultados indicam que *Boa constrictor* são susceptíveis ao OPMV e são potenciais fontes assintomáticas de infecção do vírus.
- A observação de lesões, como formação de sincícios e infiltração de leucócitos em pulmão, fígado, baço, pâncreas e SNC, demonstra que a cepa viral utilizada possui tropismo por estes órgãos.
- O isolamento do OPMV a partir de lavado traqueal demonstram que este procedimento pode ser utilizado como método diagnóstico em infecções agudas por OPMV.
- A baixa sensibilidade analítica do protocolo de RT-PCR adotado indica a necessidade de ajustes no procedimento de diagnóstico molecular. O aprimoramento deste método poderá poderá torná-lo uma importante ferramenta diagnóstica em plantéis de boídeos.

REFERÊNCIAS

AHMED, R.; MORRISON, L. A.; KNIPE, D. M. Persistence of viruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology.** 3ºed., Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, v.1, cap. 8, p. 221-241, 1996.

AHNE, W.; BATTS, W. N.; KURATH, G. WINTON, J. R. Comparative sequence of sixteeen reptilian paramyxoviruses. **Virus Researc,** v. 63, p. 65-74, 1999.

ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural cahracteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). **American Journal of Veterinary Research,** v. 60, n. 4, p. 509-514, 1999.

AZEVEDO, I. L. M.; PRIETO SILVA, A. R. B.; CARMONA, E.; LEE HO, P. Characterization of a paramyxovirus from Fer de Lance viper: partial nucleotide sequence of putative fusion protein. **Archives of Virology,** v. 156, p. 51-57, 2001.

BARTEN, S. L. Egg retention in captive snakes. **Bulletin of the Chicago Herpatologycal Society,** v. 21, n. 3-4, p. 65-71, 1986.

BLAHAK, S. Isolation and characterization of paramyxoviruses from snakes and their relationship to avian paramyxoviruses. **Journal of Veterinary Medicine,** v. 42, p. 216-224, 1995.

BRADBURRY, J. F. Genus II Xanthomonas. In: KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians and Walkins, v. 1, p. 199-210, 1984.

BRENNER, D. J. Enterobacteriaceae. In: KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians and Walkins, v. 1, p. 408-516, 1984.

CALIXTO, S.; BALDASSI, L.; MOULIN, A. A. P.; HIPOLITO, M. *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abcesso em serpente. **Revista de Microbiologia,** v. 17, n. 1, p. 28-30, 1986.

CAMBRE, R. C.; GREEN, D. E.; SMITH, E. E.; MONTALI, R. J.; BUSH, M. Salmonelosis and arizonisis in reptile collection at the National Zoological Park. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 177, n. 9, p. 800-803, 1980.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology. In : MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery,** Philadelphia: WB Saunders Company, p. 248-257, 1996.

CHIODINI, J. S.; SUNDBREG, J. P. Blood chemical values of the common *Boa constrictor*. **American Veterinary Research,** v. 3, n. 49, p. 1701-1702, 1982.

CLARK, H. F.; LIEF, F. S.; LUNGER, P. D.; WATERS, D.; LELOUP, D. W.; WYLWE, R. W. Fer de Lance virus (FDLV): a probable Paramyxovirus isolated from a reptile. **Journal of General Virology,** n. 44, p. 405-418, 1979.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária.** 3º ed. São Paulo: Manole, 1984.

COLLINS, P. L.; CHANOCK, R. M.; McINTOSH, K. Parainfluenza viruses In: FIELDS, H. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology.** 3º ed. Philadelphia: Raven, p. 1205-1241, 1996.

CONTRAN R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins- pathologic basis of disease**. 6º ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 1400, 2000.

COOPER, J. E.; JACKSON, O. F. **Diseases of the Reptilia**. London: Academic Press, 1981.

COOPER, J. E.; LEACKEY, J. H. E. A sapticemic disease of eastern african snakes associated with enterobacteriacea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 1, p. 80-84, 1976.

COOPER, J. E.; WILLIANS, D. L. Veterinary perspectives and techniques in husbandry and research. In: WARWICK, C.; FRYE, F. L. **Health and welfare of captive reptiles.** London: Chapman & Hall, p. 98-111, 1995.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L **Robbins- pathologic basis of disease**. 6º ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

DIAS, J. L. C.; NICHOLS, D. K. Neoplasia in snakes at National Zoological Park, Washington D.C. **Journal of Comparative Pathology,** v.120, p.89-96, 1996.

FOELSH, D. W.; LELOUP, P. Fatale endemische Infektion in einem Serpentarium. **Tierarzt Praxis,** n. 4, p. 527-536, 1976.

FRANK, W.; EISENBÜGEL, E. **Heimtierkrankheiten**. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 1985. p.402.

FRANKE, J.; ESSBAUER, S.; AHNE, W.; BLAHAK, S. Identification and molecular characterization of 18 paramyxoviruses isolated from sankes. **Virus Research,** n. 80, p. 67-74, 2001.

GÖBBEL, L.; SCHILDGER, B. J.; SPÖRLE, H. Die häufgisten Erkrankungen bei Echsen und Schlangen in der tierärztlichen Praxis. **Der Prektishe Tierarzt,** v. 71, n. 10, p. 47- 50, 1990.

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

GRIFFIN, D. E.; BELINI, W. J. Measles virus. In: FIELDS, H. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology.** 3º ed., Philadelphia, Raven Publishers, p. 1267-1312, 1996.

GUILLETTE, L. J.; CREE, A.; ROONEY, A. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: WARWICK, C.; FRYE, F. L. **Health and welfare of captive Reptiles.** London: Chapman & Hall, p. 33-81, 1995.

HAN, J.; KRIEKEN, J. M.; VELDE, J. Spleen. In: STERNBERG, S. S. **Histology for Pathologists**. 2º ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.675-685.

HEYWOOD, R. Aeromonas infection in snakes. **Cornell Veterinary,** n.58, p.236-241, 1968.

HOGE, A.Y.A. **Neoplasias renais espontâneas em *Bothrops moojeni* (HOGE, 1966):** um estudo morfológico, etiológico e prospectivo. 1997. 83 f. Tese (Doutorado em Patologia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

HOMER, B. L.; SUNDBERG, J. P.; GASKIN, J. M.; SCHUMACHER, J.; JACOBSON, E. R. Immunoperoxidase detection of ophidian paramyxovirus in snake lun using a polyclonal antibody. **Journal of Veterinary Diagostic Investigation,**. n. 7, p. 72-77, 1995.

HOMER, B. L. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island Rattlesnakes**. Veterinary Pathology**, n. 34, p. 450-459, 1997.

IIZUKA, H.; CANTER, H. M.; OLIVEIRA, E. P.; HIGASHI, H. G.; ROSA, R. R. Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor* em cativeiro. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47-48, p. 113-120, 1984.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J.M .; SIMPSON, C. F.; TERRELL, T. G. Paramyxo- like infection in a Rock Rattlesanke. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 177, p.796- 799, 1980.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; PAGE, D.; IVERSON, W. O.; JOHNSON, J. W. Illness Associated with a paramyxo-like Virus Infection in a zoologic collection of snakes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 11, p. 1227-1230, 1981.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; FLANAGAN, J. P.; ODUM, R. O. Antibody responses of Western Diamondback Rattlesnakes to activated ophidian paramyxovirus vaccines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 22, p.184-190, 1991.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; WELLS, S.; BOWLER, B. S.; SCHUMACHER, J. Epizootic of ophidian paramyxovirus in a zoological collection: pathological, microbiological and sorological findings. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 23, p.318-327, 1992.

JACOBSON, E. R. Inplications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/ endangered reptiles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 3, p. 245-255, 1993.

JACOBSON, E. R.; ADAMS, H. P.; GEISBERT, T. W.; TUCKER, S. J.; HALL, B. J.; HOMER, B. L. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island Rattlesankes, *Crotalus unicolor*. **Veterinary Pathology**, v. 34, p.450-459, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9º ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999.

KANNENE, J. B.; TAYLOR, R. F.; SIKARSKIE, J. G.; MEYER, T. J.; RICHTER, N. A. Disaeses Patterns in Detroit Zoo: a study of reptilian and amphibian populations from 1973 through 1983. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 11, p. 1132-1133, 1985.

KINDERMANN, J.; KÜBBER- HEISS, A.; KERSCHBAUER, P.; NOWOTNY, N. Phylogenetic analysis of the L and HN gene of ophidian paramyxoviruses. **Archives of Virology**, n. 146**,** p.1021- 1035, 2001.

KOLESNIKOVAS, C.K.M. **Patologia comparada de cascavéis mantidas em cativeiro.** 1997. 59 f. Dissertação (Mestrado em Patologia)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

KOLESNIKOVAS, C. K. M.; GREGO, K. .F.; ALBUQUERQUE, L. C. R.; JACOBSON, E. R.; MEHNERT, D. U.; MONEZI, T. A.; CATÃO- DIAS, J. L Ophidian Paramyxovirus in brazilian urutus (*Bothrops alternatus*). In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 2002, Milwaulkee. **Anais**: Milwaulkee, American Association of Zoo Veterinarians, 2002.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSK, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, H. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology.** 3º ed., Philadelphia; Raven Publishers, 1996. p. 1177-1203.

MANVELL, R. J.; GEACH, M.; LEWIS, J. C. M. Isolation of ophidian paramyxovirus type 7 from a Reticulated Python in the UK. **The Veterinary Record**, n. 9, p. 696, 2000.

MAVRIDIS, S. C.; HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; MOULIN, A. A. P. Inquérito bacteriológico de serpentes doentes e mortas mantidas em cativeiro. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, n. 1, p. 55-62, 1993.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE Riqueza de Espécies do Brasil. Disponível em <www.mma.gov.br>. Acesso em ago. 2003.

MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; SADATSUNE, T.; ANDRADE, J. C. R. Isolamento de Arizona a partir de animais de sangue frio. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 40, n. 2, p. 137-138, 1973.

MORI, A. Effects of food amount on the skin shedding cycle of the young colubrid snake. **Japanese Journal of Herpetology**, v. 12, n. 4, p. 147-150, 1988.

MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 1-27, 1988.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, n. 31, p. 735-738, 1952.

NOGUEIRA, M. F.; SILVA, R. J.; BARELLA, T. H.; RIBEIRO, M. C. M.; LOPES, C. A. M.; ARAÚJO Jr., J. P. Surto de paramixovirose em cascavéis. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 10; 2001, São Paulo. **Anais:** São Paulo, Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**.** 2001, p. 94.

OGAWA, M.; AHNE, W.; ESSBAUER, S. Reptilian viruses: adeno-virus like agent isolated from a Royal Phyton. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 39, p. 732-736, 1992.

ÓROS, J.; TUCKER, S.; JACOBSON, E. R. Inclusion body disease in two Captive boas in the Canary Islands. **The Veterinary Record**, n. 5, p. 283-285, 1998.

OROS J.; TORRENT A.; CASTRO P.; DENIZS.; ARENCIBIA A.; JACOBSON E.R.; HOMER B.L. Immunohistochemical detection of ophidian paramyxovirus in snakes in the Canary Islands. **Veterinary Rececord**, n. 149, p. 21-23, 2001.

PAGAN, O.; MÜLLER, M. Disecdysis in snakes: non infectious and infectious aetiophatogenesis, with a special reference to the first viral dermatitis. **Schweitzer Archieves Tierheilkrankheiten**, v. 132, p. 409-484, 1990.

POPOFF, M. Aeromonas. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Walkins, 1984. v. 1, p. 545-548.

POTGIEGER,L.N.D.; SIGLER,R.E.; RUSSEL, R.G. Pneumonia in Ottoman Vipers associated with a parainfluenza- 2 like virus. **Journal of Wildlife Diseases**, n. 3, p. 355-360, 1987.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRING, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1991.

QUEIROZ, A. P. S.; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U. Electropositive Filter Membrane as na Alternative for Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p.4614-4618, 2001.

RICHTER, G. A.; HOMER, B. L.; MOYER, S. A.; WILLIANS, D. S.; SCHERBA, G.; TUCKER, S. J.; HALL, B. J.; PEDERSEN, J. C.; JACOBSON, E. R. Characterization of paramyxovirus isolated from three snakes. **Virus Research**, n. 43, p. 77-83, 1996.

ROSENFELD, G Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 36, p. 209-214, 1947.

ROSENTHAL, K. L.; MADER, D. R. Microbiology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery.** Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 117-124.

SCHUMACHER, J. Adenovirus like infection in two Rosy Boas (*Lichanura trivirgata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 25, n. 3, p. 461-465, 1994.

SCHUMACHER, , J. Viral diseases. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. p. 224-234.

SELBITZ, H. J.; ENGELMANN, W. E. Die häufgsten bakteriellen Infektionen bei Reptilien. **Monatschaft für Veterinärmedizin**, v.39, p. 383-386, 1984.

SOVERI, T. Observations of bacterial diseases of captive snakes in Finland. **Nordsk Veterinary Medicine**, n. 36, p. 38-42, 1984.

SYPEK, J.; BORYSENKO, M. Reptiles. In : ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. **Vertebrate Blood Cells.** Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 211-255.

TUCUNDUVA, M.; BORELLI, P.; SILVA J. R. M. C. Experimental study of induced inflammation in the brazilian boa (B*oa constrictor constrictor*). **Journal of Comparative Pathology**, n. 125, p. 174-181, 2002.

TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. In: FIELDS, H. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology.** 3º ed., Philadelphia: Raven Publishers, 1996, p. 173-218.

WALLACH, J.D.; BOEVER, W.J. Reptiles and amphibians In: WALLACH, J.D.; BOEVER, W.J. **Diseases of Exotic Animals**. Philadelphia: WB Saunders, 1983. p. 979-1048.

WEST, M. G.; RAYMOND, J.; LATINER, K. S.; NORDHAUSEN, R. Meninfoencepahlitis in a Boelen's Python (*Morelia boeleni*) associated with paramyxovirus infection. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 32, p. 360-365, 2001.

WHITTON, J.L.; OLDSTONE, B.A. Immune Response to Viruses. In: FIELDS, H. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 3º ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. p. 345-374.

WOZNIAK, E.; McBRIDE, J.; DeNARO, D.; TARARA, R.; WONG, V.; OSBURN, B. Isolation and characterization of na atigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in Boa constrictors chronically infected with the Inclusion Body disease Virus (IBDV: Retroviridae). **The Veterinary Pathology**, n. 37, p. 449-459, 2000.

ZACARIOTTI, R. L.; GATTAMORTA, M. A.; ALBUQUERQUE, L. C. R.; GREGO, K. F.; OLIVEIRA, A. F.; FERNANDES, W.; CATÃO- DIAS, J. L. Dermatite Vesicular Bacteriana em coral verdadeira (*Micrurus corallinus*) causada por *Xanthomonas maltophila.* In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 4., 2000, São Pedro, SP. **Anais: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**, 2000. p. 23.

ANEXOS

ANEXO 1

Resultados de exames hematológicos animal nº 1

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
	640,00	5,00	8,90	29,00	45,31	13,90	30,68	26,50				

ANEXO 2

Resultados de exames hematológicos animal nº 2

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev/02	520,00	2,50	10,90	25,00	48,07	20,96	43,60	9,00				
21/fev/02	420,00	3,50	9,10	23,00	54,76	21,66	39,56	7,50	70,00	22,00	0,00	8,00

ANEXO 3

Resultados de exames hematológicos animal nº 3

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev/02	460,00	3,50	8,80	23,00	50,00	19,13	38,26	5,00				
21/fev/02	250,00	0,50	8,60	22,00	88,00	34,40	39,09	1,50				

ANEXO 4

Resultados de exames hematológicos animal nº 4

Data	Hemácias (10^6/mm^3)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev	450,00	1,00	9,00	21,00	46,66	20,00	42,85	3,50	69,00	22,00	0,00	9,00
21/fev	390,00	3,00	9,30	25,00	64,10	23,84	37,20	10,00	62,00	25,00	0,00	13,00
25/fev	460,00	3,50	11,20	26,00	565,21	243,07	43,07	7,50	39,00	39,00	0,00	22,00

ANEXO 5

Resultados de exames hematológicos animal nº 5

Data	Hemácias (10^6/mm^3)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev	990,00	2,00	9,00	24,00	24,24	9,09	37,50	11,50	73,00	10,00	0,00	17,00
21/fev	540,00	3,00	9,50	26,00	48,14	17,59	36,53	6,50	79,00	15,00	0,00	6,00
25/fev	490,00	3,00	10,60	28,00	571,42	21,63	37,85	2,50	57,00	23,00	2,00	18,00

ANEXO 6

Resultados de exames hematológicos animal nº 6

Data	Hemácias (10^6/mm^3)	Leucócitos (mm^3mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev	350,00	1,00	7,70	20,00	57,14	22,00	38,50	9,00	64,00	23,00	0,00	13,00
21/fev	410,00	9,00	9,20	23,00	56,09	22,43	40,00	8,50	62,00	19,00	0,00	19,00
25/fev	340,00	2,00	9,40	24,00	70,58	27,64	39,16	7,00	68,00	20,00	0,00	12,00
04/mar	480,00	12,50	8,90	39,00	81,25	18,54	22,82	16,00	25,00	41,00	5,00	29,00

ANEXO 7

Resultados de exames hematológicos animal nº 7

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev	300,00	3,50	9,70	23,00	76,66	32,33	42,17	4,50	71,00	17,00	1,00	11,00
21/fev	430,00	1,50	10,40	26,00	60,45	24,18	40,00	4,00	88,00	7,00	0,00	5,00
25/fev	510,00	2,50	9,60	25,00	49,01	18,82	38,40	4,50	86,00	10,00	0,00	4,00
04/mar	370,00	2,00	8,30	37,00	100,00	22,43	22,43	5,00	58,00	34,00	0,00	8,00

ANEXO 8

Resultados de exames hematológicos animal nº 8

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
26/10/01	530,00	3,00	8,20	23,00	43,30	15,47	35,65	11,00	60,00	31,00	5,00	4,00
29/11/01	370,00	3,00	7,20	26,00	70,26	19,45	27,69	4,50	52,00	27,00	1,00	20,00
03/12/01	460,00	11,50	31,00	673,91	18,47	27,41	27,41	2,50	9,00	58,00	0,00	33,00
17/12/01	480,00	7,50	7,60	26,00	54,16	15,83	29,23	12,00	55,00	15,00	3,00	27,00

ANEXO 9

Resultados de exames hematológicos animal nº 9

Data	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
18/fev	340,00	5,00	9,00	26,00	76,47	26,47	34,61	3,00	45,00	41,00	0,00	14,00
21/fev	400,00	1,50	6,10					1,00	31,00	53,00	0,00	16,00
25/fev	560,00	3,50	10,40	29,00	51,78	18,57	35,86	6,00	66,00	22,00	0,00	12,00
04/mar	540,00	3,00	9,10	28,00	51,85	16,85	32,50	8,50	69,00	20,00	0,00	11,00
11/mar	440,00	0,50	7,90	22,00	50,00	17,95	35,90	5,00	76,00	18,00	0,00	6,00

ANEXO 10

Resultados de exames hematológicos animal nº 10

Data	**Hemácias (10^6/mm^3)**	**Leucócitos (mm^3)**	**Hemoglobina (g/dl)**	**Hematócrito (%)**	**VCM (fl)**	**HCM (pg)**	**CHCM (%)**	**Trombócitos (mm^3)**	**Linfócitos (%)**	**Azurófilos (%)**	**Basófilos (%)**	**Heterófilos (%)**
18/fev	440,00	10,00	20,00	25,00	56,81	18,40	32,40	45,00	76,00	20,00	0,00	4,00
21/fev	130,00	1,50	2,70	9,00	69,23	20,76	30,00	4,00	4,00	94,00	0,00	4,00
25/fev	620,00	1,00	9,10	26,00	41,93	14,67	35,00	4,00	77,00	15,00	0,00	8,00
04/mar									81,00	11,00	0,00	8,00
11/mar	590,00	2,00	7,50	23,00	38,98	12,71	32,60	3,50	62,00	24,00	0,00	14,00
15/abr	260,00	3,00	4,50	20,00	76,92	17,30	22,50	2,50	68,00	30,00	0,00	2,00

ANEXO 11

Resultados de exames hematológicos animal nº 11

Data	**Hemácias (10^6/mm^3)**	**Leucócitos (mm^3)**	**Hemoglobina (g/dl)**	**Hematócrito (%)**	**VCM (fl)**	**HCM (pg)**	**CHCM (%)**	**Trombócitos (mm^3)**	**Linfócitos (%)**	**Azurófilos (%)**	**Basófilos (%)**	**Heterófilos (%)**
18/fev	490,00	2,00	5,90	26,00	53,00	12,04	22,69	11,00	89,00	6,00	0,00	5,00
21/fev	420,00	3,50	10,10	25,00	59,52	24,04	40,40	6,00	74,00	15,00	0,00	11,00
25/fev	380,00	7,50	12,20	38,00	100,00	32,10	32,10	12,00	71,00	23,00	1,00	5,00
04/mar	370,00	1,00	7,60	23,00	62,16	20,54	33,04	3,50	82,00	12,00	0,00	6,00
11/mar	320,00	1,00	6,90	20,00	62,50	21,55	34,50	2,00	78,00	16,00	0,00	8,00
15/abr	290,00	3,00	8,50	29,00	100,00	29,31	29,10	3,50	90,00	8,00	0,00	2,00

ANEXO 12

Resultados de exames hematológicos animal nº 12

Data	Hemácias (10^6/mm^3)	Leucócitos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Trombócitos (mm^3)	Linfócitos (%)	Azurófilos (%)	Basófilos (%)	Heterófilos (%)
21/fev	400,00	6,00	8,50	24,00	60,00	21,25	35,41	7,00	77,00	10,00	0	13,00
25/fev	410,00	2,00	8,60	24,00	58,53	20,97	35,83	10,00				
04/mar	470,00	7,00	8,30	25,00	53,19	17,65	33,20	14,00	79,00	15,00	0	6,00
11/mar	510,00	16,00	7,40	25,00	45,09	14,50	32,17	15,00	79,00	8,00	0	13,00
15/abr	260,00	8,00	7,50	23,00	88,46	28,84	32,60	12,00				