

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

DETERMINACIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium*
EN SERPIENTES DEL LABORATORIO DE HERPETOLOGÍA
DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

VÍCTOR JESÚS JIMÉNEZ ORTÍZ

Asesor:

MVZ. Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo

México D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi madre, que con su trabajo arduo y constante me ha dado un ejemplo de superación, demostrando que cuando se fijan metas se debe luchar por alcanzarlas; que aunque haya tropiezos en la vida, mientras exista la confianza en uno mismo y de la gente que se ama, no hay obstáculo que te detenga.

A mi padre, que al no estar presente me hace esforzarme día a día para ser una mejor persona.

A Anwar, por otorgarme la dicha de tener un hermano.

Al MVZ. Luis Grajales Tam, por su paciencia, apoyo, confianza y por todas las aportaciones enriquecedoras a mi vida; pero sobre todo por tu amistad.
Que en paz descanse.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo por su ayuda y paciencia para realizar este trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	22
REFERENCIAS.....	25
CUADROS.....	28
IMÁGENES.....	31

RESUMEN

JIMÉNEZ ORTÍZ VÍCTOR JESÚS. Determinación de ooquistes de *Cryptosporidium* en serpientes del Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. (Bajo la supervisión de: MVZ. Juan Antonio Figueroa Castillo).

Con el objetivo de determinar la presencia de *Cryptosporidium* en heces de las serpientes de la colección del Laboratorio de Herpetología de la UNAM Campus FES Iztacala, y complementar los programas de Medicina Preventiva, se trabajó con 70 serpientes pertenecientes a 3 familias, 8 géneros y 15 especies, el tamaño de la muestra (n= 70), correspondió al 32% de la colección total (208 serpientes). Se colectaron muestras seriadas de heces hasta en 7 ocasiones, se tiñeron mediante la técnica modificada de Kinyoun y se examinaron por microscopia convencional. El porcentaje global de organismos positivos a ooquistes de *Cryptosporidium sp.* fue de 54.28% con un intervalo de confianza al 95% (IC) de 42.6 a 65.4%. Los mayores porcentajes de positivos se observaron en los géneros *Pituophis* (20 %), *Boa* (15.7%) y *Crotalus* (15.7%). El 17.1% de los organismos venenosos fue positivo a ooquistes de *Cryptosporidium sp.* mientras que en los inofensivos lo fue el 37.1% (diferencias estadísticamente significativas p=0.029). Se observaron 4 tipos de ooquistes de los cuales el 7.8%, podrían probablemente corresponder a *C. parvum* o *C. saurophilum*, el 47.3%, a *C. serpentis*, el 31.5% a *C. muris* y el 15.7% a otra especie.

INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de gran interés en la actualidad, debido a que afecta a una gran diversidad de huéspedes como: el hombre y otros mamíferos, anfibios, aves, peces y reptiles. De todas las especies animales, los reptiles, especialmente las serpientes son afectadas con mayor severidad, debido a la cronicidad de la enfermedad. ⁽¹⁾

En los reptiles, la mayoría de los casos clínicos se presentan en animales cautivos, ^(1,2) por esto se consideró necesario determinar la frecuencia de *Cryptosporidium sp.* en la colección de serpientes del Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala.

Taxonomía

Cryptosporidium es un protozooario parásito cuya ubicación taxonómica no se ha definido con exactitud, de manera genérica su clasificación es la siguiente: ⁽¹⁾

Reino:	Protozoa (Goldfuss, 1818)
Filo:	Apicomplexa (Levine, 1970)
Clase	Sporozoa (Leuckart, 1879)
Família:	Cryptosporidiidae (Leger, 1911)
Género:	<i>Cryptosporidium</i> (Tyzzer, 1907)

Las dos especies que se han reconocido en reptiles son *Cryptosporidium serpentis* en serpientes y *Cryptosporidium saurophilum* en lacertílicos, que difieren por su morfología, los ooquistes de *C. serpentis* son más grandes que los de

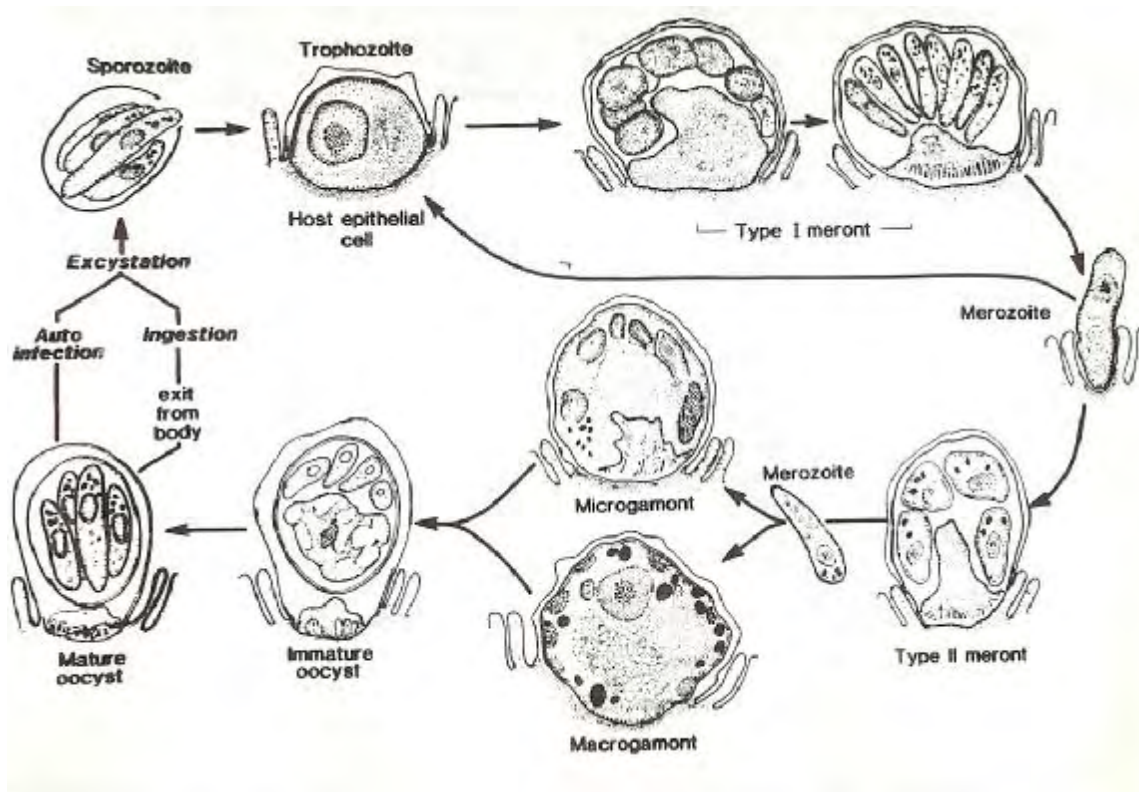
C. saurophilum. Sin embargo, en estudios morfométricos se han encontrado al menos 5 morfotipos, lo cual sugiere la existencia de otras especies. ⁽²⁾

Morfología

Los ooquistes se observan esféricos, translúcidos y refringentes al microscopio óptico. El tamaño de *C. serpentis* es de $6.1 \times 5.3\mu$ (5.7 a 6.5×4.8 a 5.5μ). ^(3,4)

Ciclo biológico

El ciclo de vida en reptiles no ha sido bien descrito, se piensa que es similar al de los mamíferos. A continuación se describe el ciclo de *C. parvum*.



Tomado de: Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Criptosporidiosis of Man and Animals. Ed. CRC Press 1990. ⁽¹⁾

Cryptosporidium sp. habita en una vacuola parasitófora (producida por el parásito) confinada en las microvellosidades. Los ooquistes de *Cryptosporidium sp.* esporulan dentro de las células del huésped y son infecciosas inmediatamente después de ser liberados en las heces.

Los ooquistes son ingeridos por el huésped, liberando los **esporozoítos** que parasitan las células epiteliales gastrointestinales (gástricas en el caso de reptiles). Los esporozoítos se transforman en **trofozoítos** esféricos con un núcleo prominente. El núcleo se divide como resultado de la multiplicación asexual referida como merogonia o esquizogonia, dando como resultado dos tipos morfológicos de **esquizontes**:

Tipo I: Contienen de 6 a 8 núcleos, que se convertirán en **merozoítos**. Cada uno de estos puede invadir a otra célula, donde se puede desarrollar en otro esquizonte tipo I

Tipo II: Produce 4 merozoítos.

Los merozoítos Tipo II se liberan e invaden nuevas células para llevar a cabo la reproducción sexual, formando tanto macrogametos (femeninos) como microgametos (masculinos), estos últimos se dividen por fisión múltiple dando origen a 16 microgametocitos por cada microgameto.

Los microgametocitos maduran rompiendo los microgametos y penetran en los macrogametos fecundándolos. El macrogameto fecundado origina un cigoto, en el que ocurre una meiosis que produce cuatro esporozoítos y un cuerpo residual cristalino (ooquiste inmaduro).

Existen dos tipos de ooquistes maduros, unos con pared delgada y otros con pared gruesa. Los primeros eclosionan rápidamente dentro del huésped

(auto-infección endógena) y los segundos salen en las heces del huésped hacia el exterior. Cada generación de oocistos puede desarrollarse y madurar en 12 a 14 horas. ⁽¹⁾

Transmisión

La transmisión de este parásito es vía oro-fecal y por vía mecánica como son cajas, agua, bebederos, utensilios, etc. Esto es debido a que los ooquistes infectantes tienen una pared gruesa que los hace resistentes al medio ambiente. ^(5,6,7)

Los reptiles no se infectan por las especies de *Cryptosporidium* de los roedores que se les proporcionan en la dieta. En 1998 se llevó a cabo un estudio en donde se realizaron transmisiones experimentales de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* aislados de mamíferos, aves y reptiles a serpientes cautivas. Ninguna de las serpientes utilizadas contenían ooquistes de *Cryptosporidium sp.* antes de la inoculación y todas fueron negativas a anticuerpos específicos de *Cryptosporidium sp.* ⁽⁷⁾

Las serpientes (*Elaphe obsoleta*) que fueron inoculadas con ooquistes aislados de *C. muris* (ratón, terneros), *C. muris-like* (camélidos), *C. wrairi* (cerdos de guinea), *C. bailey* (pollos), *C. meleagridis* (pavos), no desarrollaron la infección a la semana 6 y 10 post-inoculación, esto fue determinado mediante exámenes histológicos de la región gástrica. Estas serpientes también fueron seronegativas a anticuerpos específicos de *Cryptosporidium sp.* Sin embargo, en la segunda semana post-inoculación el 35% de las muestras fecales se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium.* ⁽⁷⁾

Todas las serpientes (*E. obsoleta*) que fueron inoculadas con ooquistes aislados de *Cryptosporidium sp.* de tortugas acuáticas, semiacuáticas, terrestres, lagartijas y camaleones desarrollaron infección. El tamaño de los ooquistes obtenidos de estas serpientes fue de 6.7 x 6.3. ⁽⁷⁾

En la semana 6 post-inoculación, las serpientes exhibieron pequeñas áreas desorganizadas y adelgazamiento del epitelio gástrico, además de infiltración de neutrófilos. ⁽⁷⁾

Una serpiente (*E. obsoleta*) inoculada con ooquistes de *C. serpentis* originados de una serpiente (*Lampropeltis conati*) subclínicamente infectada, desarrolló hiperplasia moderada de las células secretoras de moco. ⁽⁷⁾

Ninguna de las serpientes desarrollaron signos clínicos, como inflamación de la región gástrica, sin embargo, tres serpientes infectadas con ooquistes de *C. serpentis* originados de serpientes subclínicamente infectadas, regurgitaron 2 veces la presa. ⁽⁷⁾

A la semana 10 post-inoculación progresaron considerablemente los cambios histopatológicos, 9 de 12 serpientes fueron eutanasiadas por presentar hiperplasia. ⁽⁷⁾

El estudio demostró que *C. muris*, *C. muris-like*, *C. wairi*, *C. bailey* y *C. meleagridis* no son infecciosos para las serpientes, por lo que las serpientes en cautiverio que son alimentadas a base de aves y roedores no pueden iniciar la infección mediante la ingestión de una presa infectada como había sido sugerido anteriormente. ⁽⁷⁾

También el estudio demostró que los ooquistes originados de las lagartijas, tortugas acuáticas, semiacuáticas, terrestres y camaleones inducen severas

infecciones en serpientes, por lo que mantener serpientes con otros reptiles en una misma área se considera una causa potencial de transmisión de *Cryptosporidium* sp. ⁽⁷⁾

Cryptosporidium sp. es un patógeno que puede sobrevivir en el agua y las serpientes frecuentemente comparten hábitats semiacuáticos con anfibios, por lo que se debe considerar a los anfibios como potenciales vectores mecánicos que pueden transmitir *C. serpentis* a los reptiles. ⁽⁸⁾

En contraparte, la infección de *C. serpentis* en lacertilidos es usualmente asintomática. ⁽²⁾

Patogenia y lesiones

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos y aves, los cambios patológicos en serpientes con criptosporidiosis se limitan al estómago y varían en su severidad. ⁽⁹⁾

Los animales afectados que de manera crónica eliminan ooquistes sin manifestación clínica, pueden tener un engrosamiento normal de la mucosa gástrica, mientras que los clínicamente afectados muestran engrosamiento severo de esta. ⁽⁹⁻¹¹⁾

Las células secretoras de ácidos de la mucosa gástrica se encuentran marcadamente reducidas en número, además las células secretoras de moco tienden a presentar hiperplasia. ^(1,9-11)

Cuando la enfermedad es crónica, la mucosa se atrofia, la submucosa y muscular de la mucosa presentan fibrosis. Aunado a esto, generalmente se

encuentra edema en la lámina propia y en las tunicas musculares, además de petequias, hemorragias y necrosis focal en el estómago. ^(1,10,11)

Como resultado de estas alteraciones, el diámetro luminal del estómago disminuye, la pared gástrica puede engrosarse más de 1 cm, aún en serpientes relativamente pequeñas. ^(1,10,11)

Con el estrechamiento progresivo del estómago, el animal es incapaz de digerir la presa, las serpientes pueden regurgitar de 1 a 3 días después de la ingestión, además el apetito puede estar disminuido. ^(1,9-11)

Signos

Esta enfermedad presenta dos tipos de manifestaciones. ⁽⁹⁾

- **Subclínica:**

Las serpientes clínicamente sanas son competentes para liberar ooquistes intermitentemente por años. En la colección herpetológica del zoológico de Baltimore solo se ha registrado una muerte debido a criptosporidiosis. Esta baja mortalidad ha ocurrido a pesar de la alta prevalencia en la colección de serpientes que han liberado ooquistes en las heces por más de 20 años sin exhibir signos clínicos. ^(9,12)

La mayoría de las serpientes con diagnóstico positivo, son eliminadoras intermitentes de ooquistes, oscilando en periodos donde hay un alto número de ooquistes liberados en las heces y periodos donde las heces están ausentes de *Cryptosporidium* sp. ^(3,9,10,12-14)

- **Clínica:**

La principal manifestación clínica en infecciones crónicas es la regurgitación posprandial y el engrosamiento de la mucosa del estómago debido a una gastropatía hipertrófica. ^(1,10,11)

La usual historia clínica es pérdida de peso persistente, deshidratación, desgaste de los músculos y regurgitación periódica del ratón sin digerir 3 a 4 días después de la ingestión; Estas serpientes clínicamente afectadas pueden vivir de 4 días a 2 años. ^(3,9,10-13)

Las serpientes tienen una notable inflamación en la región gástrica, localizada en el segundo tercio del cuerpo (Imágen 1). Estudios revelan engrosamiento de la pared gástrica y constricción del lumen gástrico. ^(3, 9,10,12-15)

Además de gastritis se reporta bronconeumonía. ^(3,11)

Diagnóstico

El diagnóstico en su fase subclínica es difícil, debido a que en esta etapa la eliminación de los ooquistes en las heces es intermitente. El examen histológico de múltiples tejidos del tracto gastrointestinal, provee el diagnóstico más concluyente para esta enfermedad, sin embargo, requiere del sacrificio del espécimen. ^(1,3,13,16,17)

La biopsia gástrica con examinación histológica, no siempre es suficiente para realizar el diagnóstico subclínico de la enfermedad. ⁽¹⁶⁾

La endoscopia también se ha utilizado, pero si no hay hallazgo de hipertrofia gástrica no puede ser diagnosticado como negativo. Esta técnica no es necesariamente más efectiva que la examinación fecal. ⁽⁹⁾

Existen kits de diagnóstico que detectan coproantígenos de *Cryptosporidium* sp. (MERIFLUOR^a ProSpect^b), con ayuda de anticuerpos monoclonales y se han utilizado en serpientes. Sin embargo, no siempre están disponibles los contenidos del tracto gastrointestinal. La retención de estos y la infrecuente defecación es fisiológicamente normal en muchas especies de serpientes y no está asociado a ninguna anomalía de comportamiento o de salud ^(13,16,18).

La técnica de diagnóstico más usada, por ser práctica, barata, sencilla y que no requiere del sacrificio del animal, es encontrando los ooquistes en los materiales derivados del tracto gastrointestinal (heces, comida regurgitada y secreciones), mediante la tinción Ziehl-Neelsen o modificada de Kinyoun. ⁽¹⁹⁾

Cuando no están disponibles las heces, comida regurgitada o secreciones gastrointestinales, puede realizarse un lavado y aspirado estomacal para examinarlos. ^(9,13,16,18)

La criptosporidiosis subclínica puede ser diagnosticada basada en el hallazgo de un solo ooquiste en la muestra fecal y si coincide con el tamaño y forma de los ooquistes registrados en serpientes se reportan como positivos a ooquistes parecidos (like) a *Cryptosporidium serpentis*. Sin embargo, en ocasiones se requiere de examinar hasta 7 muestras de heces para detectar una positiva,

^a Merifluor: *Cryptosporidium/Giardia* test, Meridian diagnostic, Cincinnati, OH, USA)

^b ProSpect: Alexon Inc, Sunnyvale, CA, USA

debido a esto se recomienda examinar muestras seriadas hasta en 7 ocasiones con el objetivo de disminuir diagnósticos falsos negativos. ^(12,13,16,18)

Esta técnica de diagnóstico debe de ser usada exclusivamente para la determinación de serpientes positivas a *Cryptosporidium serpentis* like, ya que el no encontrar ooquistes no significa que sea negativo debido a que la eliminación de ooquistes es intermitente. ⁽¹³⁾

Para el diagnóstico mediante coprología se deben seleccionar heces grandes y pesadas, debido a que las heces que no constituyen al menos el 0.41% del peso vivo del animal, contendrán una menor concentración de ooquistes. ⁽¹³⁾

La desproporción en la materia fecal es una característica fisiológica del tracto gastrointestinal de los ofidios. El contenido intestinal puede permanecer por varios periodos de tiempo y el número de defecaciones es distinto al número de presas consumidas. ⁽¹³⁾

La expulsión de desechos orgánicos de menor peso, constituye una mayor parte de orina a diferencia de las de mayor peso, en donde la mayor fracción constituye materia fecal; Esto puede explicar la baja concentración de los ooquistes en muestras fecales pequeñas con respecto al peso vivo del animal. ⁽¹³⁾

Tratamiento

En la mayoría de los animales de sangre caliente, la infección es auto-limitante con signología clínica transitoria. Se ha hecho un gran esfuerzo para descubrir un tratamiento efectivo contra *Cryptosporidium* sp. por las pérdidas económicas en terneros y el tratamiento de por vida para humanos infectados con SIDA. ⁽¹⁹⁾

Aproximadamente 50 anticoccidianos y otros agentes antiparasitarios, incluyendo sulfonamidas, han resultado inefectivos contra *Cryptosporidium sp.* en mamíferos. ⁽⁹⁾

Espiramicina y Paramomicina han demostrado resultados muy limitados en pacientes con SIDA y otros mamíferos. Halofuginona y Arprinocida produjeron pocos resultados positivos en ratones, pollos y rumiantes. ^(9,20)

En reptiles se ha utilizado:

- Sulfa Trimetroprim a dosis de 30 mg/kg, SID, por 14 días y después 1 a 3 por semana por varios meses; Este tratamiento fue inefectivo, aunque redujo el número de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces. ^(9,20)
- Espiramicina a dosis de 160 mg/kg, SID, por 10 días y Paromomicina a dosis de 100 mg/kg SID, por 7 días y después 2 veces por semana durante 3 meses; Este tratamiento fue efectivo reduciendo los signos clínicos y reduciendo o eliminado los ooquistes arrojados de heces y en contenidos de lavados gástricos; Pero en los exámenes post-mortem se observó hiperplasia gástrica y *Cryptosporidium* en varias de sus fases. ^(9,20)

En los 2 tratamientos anteriores, a las serpientes se les administró tratamiento de soporte, fluidos vía subcutánea y sondeos con comida altamente digerible, así como los terrarios fueron mantenidos a temperaturas mayores de 27°C. Estas medidas pudieron haber influido en el curso de la enfermedad o bien haber sido sinérgico con la terapia de fármacos. ^(9,20)

En 1998, Graczyk realizó un estudio donde se administró Calostro Bovino Hiperinmune (HBC), a serpientes infectadas con *Cryptosporidium serpentis*, dando

resultados satisfactorios en 2 de 3 serpientes subclínicamente infectadas, estos animales dejaron de arrojar ooquistes y en los exámenes histológicos no se encontraron fases de desarrollo del parásito. ⁽¹⁹⁾

Las serpientes clínicamente afectadas con cambios patológicos en el estómago, se les realizaron biopsias y mostraron cierta regresión en los exámenes histopatológicos; Además se redujo la concentración de ooquistes en las heces de las serpientes. ⁽¹⁹⁾

Debido a los beneficios del uso de HBC, Graczyk recomienda el uso de este tratamiento, el cual se debe administrar a dosis del 1% del peso vivo de la serpiente, una vez por semana, durante el tiempo que sea requerido. En este estudio, no todas las serpientes mejoraron y las que desarrollaron hiperplasia gástrica fueron eutanasiadas. ⁽¹⁹⁾

Epidemiología

El primer reporte de *Cryptosporidium sp.* en reptiles fue hecho en 1977 por Brownstein, quien encontró infectadas a 14 serpientes de 3 géneros y 4 especies; Los signos clínicos de la infección incluyeron regurgitación e inflamación en zona gástrica, además de cambios patológicos como gastritis hipertrófica, atrofia de células glandulares y necrosis focal de la mucosa gástrica. ⁽³⁾

Cryptosporidium serpentis es una causa considerable de morbilidad y eliminación de especímenes, por muerte natural o eutanasia obligatoria. ^(3,13)

Prevención y control

Higiene estricta y buen manejo son esenciales en el control de criptosporidiosis. ^(5,7,9)

Eliminar cualquier enfermedad ambiental, nutricional y concurrente, resulta ser mas efectiva que cualquier droga hasta el momento. ⁽⁹⁾

De los 7 desinfectantes comunes usados en lo terrarios, solo el amonio al 5%, el formol amortiguado al 10% y cloruro de benzalconio al 12% fueron efectivos para eliminar ooquistes infectantes después de permanecer 18 horas en contacto a 4°C. Los desinfectantes que no fueron efectivos incluyen iodo (1% - 4%), hipoclorito de sodio al 3%, cloruro de benzalconio (5% al 10%) e hidroxido de sodio (0.02 M). ⁽⁹⁾

Los ooquistes infectantes pueden ser neutralizados mediante a exposición a calor húmedo entre 45 y 60°C por 5 a 9 minutos. ⁽⁹⁾

Los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. permanecen infectantes de 2 a 4 meses aun a 4°C, por lo tanto la limpieza y remoción de materia orgánica debe de ser constante. ⁽⁹⁾

Las cajas utilizadas como terrarios, exhibidores, bebederos, objetos del escenario y objetos utilizados para limpiar los terrarios deben de ser lavados y desinfectados constantemente con solución de amonio, además de permitirles secarse por un periodo de al menos 3 días. ^(9,14)

Las serpientes eliminadoras de ooquistes deben de ser aisladas y su limpieza y desinfección debe de realizarse después del resto de la colección, además es imprescindible usar solo cajas, bebederos, objetos del escenario y utensilios de limpieza destinados para estos animales. ^(9,14)

Un control común es la eutanasia de serpientes clínicamente infectadas con *Cryptosporidium serpentis* like, esto prevendrá el esparcimiento de la infección en otros animales. Esta estrategia aparentemente efectiva se realizó en el zoológico de Saint Louis, Missouri, la efectividad de este método fue sustentada basándose en la reducción de infecciones por *Cryptosporidium* sp. en serpientes del zoológico. ⁽²⁾

El Vivario ó Laboratorio de Herpetología de la UNAM Campus Iztacala es actualmente un centro en el que se trabaja intensamente con herpetofauna (anfibios y reptiles) viva, teniendo en total más de 1,200 animales.

La colección se formó y sigue creciendo como resultado del aporte de animales de 4 fuentes:

A) Las donaciones hechas por particulares de animales que ellos mismos compraron o colectaron, y que son recibidos en el Laboratorio como una acción altruista para salvaguardar su integridad y darles algún uso bajo condiciones de cautiverio.

B) Aportaciones hechas por investigadores que los capturaron y fueron de alguna forma empleados para sus investigaciones específicas.

C) Material proveniente de incautaciones hechas por el Gobierno Federal, quién a carece de instalaciones y personal idóneos para cuidar correctamente a este tipo de fauna, por lo que ha recurrido a la experiencia del laboratorio para procurar la rehabilitación de los animales.

D) Finalmente, los nacimientos de animales en el propio laboratorio producto de líneas de investigación específicas para establecer colonias reproductoras de

algunas especies, actualmente ésta última se ha constituido en una fuente importante de crecimiento para la colección de anfibios y reptiles que maneja el laboratorio.

Debido a lo anteriormente expuesto y con el objeto de complementar los programas de Medicina Preventiva en el Laboratorio de Herpetología de la facultad de Estudios Superiores Iztacala, se consideró necesario determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* sp. en la colección de serpientes inofensivas y venenosas (clasificadas de esta forma por su capacidad de producir cualquier tipo de veneno).⁽²¹⁾

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar la presencia de *Cryptosporidium* sp. en las heces de las serpientes del Laboratorio de Herpetología.

Objetivo Específico:

- Realizar la tinción de Ziehl-Neelsen modificada Kinyoun ⁽¹⁴⁾. de las muestras fecales recolectadas para establecer la presencia del protozooario.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo de Febrero a Julio del 2007, en el Laboratorio de Herpetología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Facultad de Estudios Superiores Iztacala, que se encuentra en Av. de los Barrios #1 Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Edo. México.

Las muestras se analizaron en el laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Animales y tamaño de muestra

Se trabajó con 70 organismos pertenecientes a 3 familias (*Viperidae*, *Colubridae*, *Boidae*), 8 géneros (*Crotalus*, *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Trimorphodon*, *Boa*, *Pituophis*, *Masticophis*, *Elaphe*) y 15 especies (*molossus*, *bilineatus*, *asper*, *atrox*, *triseriatus*, *viridis*, *scutulatus*, *biscutatus*, *lepidus*, *simus*, *constrictor*, *melanoleucus*, *deppei*, *mentovarius*, *guttata*).⁽²¹⁾

El tamaño de la muestra correspondió al 32% de la colección total (208 serpientes).

A cada animal, se le colectaron muestras de heces seriadas hasta en 7 ocasiones con el objetivo de disminuir diagnósticos falsos negativos.^(12,13,16)

Toma de muestra

Las heces se recogieron del terrario con guantes estériles, se depositaron en tubos de ensaye lavados y desinfectados previamente con KRIT (Clorhexidina al 12%), identificados con el número de expediente del animal.

A cada tubo se le agregó solución de cloruro de sodio al 0.9% para hidratar las muestras y se mantuvieron en refrigeraron a 4°C hasta su análisis. ^(2,13)

De cada organismo se registró el nombre científico, fecha de recolección, peso vivo y peso de las heces; Esto último debido a que las heces que no constituyan al menos el 0.41% del peso vivo del animal, contendrán una menor concentración de ooquistes, por lo que pueden ser diagnosticadas como falsas negativas. ^(3,13)

Procesamiento de la muestra Kinyoun modificada. ⁽²²⁾

- 1- De cada muestra se realizaron 8 frotis en un portaobjetos desengrasado y se dejaron secar a temperatura ambiente (Imágen 2).
- 2- Se fijaron los frotis cubriéndolos con unas gotas de alcohol metílico (Lab. JT-Baker), y permitiendo la evaporación del alcohol a temperatura ambiente.
- 3- Los frotis fijados se colocaron en una fuente de tinción con Fuscina Fenicada (Lab. Hycel, Cat. 6151), durante 5 minutos.
- 4- Los frotis se enjuagaron suavemente con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante.
- 5- Posteriormente, los frotis se decoloraron agregándoles Alcohol Ácido (97ml alcohol absoluto + 3ml ácido clorhídrico).
- 6- Los frotis se enjuagaron suavemente con agua corriente hasta quitar los residuos de colorante.
- 7- Se agregaron unas gotas de Azul de Metileno 0.3%, hasta cubrir los frotis y se dejó actuar durante 15 segundos.

- 8- Los frotis se enjuagaron suavemente con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante.
- 9- Los frotis se secaron a temperatura ambiente. Se les colocó una gota de aceite de inmersión y se examinaron en el microscopio a 1,000 aumentos. Los ooquistes se midieron con una escala micrométrica. Los ooquistes se observaron de color rosa brillante a fusha en contraste con el fondo de color azul (Imágen 3).

Análisis de los datos

Se obtuvieron porcentajes e intervalos de confianza al 95% y se realizó una prueba de ji-cuadrada para determinar diferencias entre la frecuencia de serpientes positivas a ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en serpientes inofensivas y venenosas (clasificadas de esta forma por su capacidad de producir cualquier tipo de veneno).⁽²¹⁾

Resultados

Se examinaron las heces de 70 organismos diferentes, pertenecientes a 15 especies. Considerados 39 (55.71%) como inofensivos y 31 (44.28%) venenosos. La mayoría de las muestras fueron de *Boa constrictor imperator* y de *Pituophis deppei deppei* (24.3% cada una), y en menor proporción (1.4%) de *Bothrops asper*, especies de género *Crotalus*, *Elaphe guttata* y *Trimorphodon biscutatus* Cuadro 1.

El porcentaje global de organismos positivos a ooquistes de *Cryptosporidium* sp. fue de 54.28% con un intervalo de confianza al 95% (IC) de 42.6 a 65.4%.

Los mayores porcentajes de organismos positivos se observaron en los géneros *Pituophis* (20%), *Boa* (15.7%) y *Crotalus* (15.7%). En los géneros *Bothrops*, *Elaphe* y *Trimorphodon* no se detectaron ooquistes. Cuadro 2.

El 17.1% de los organismos venenosos fue positivo a ooquistes de *Cryptosporidium* sp. mientras que en los inofensivos lo fue el 37.1% (diferencias estadísticamente significativas $p=0.029$). Cuadro 3

Se observaron ooquistes de diferentes tamaños y se agruparon en cuatro categorías de acuerdo a los rangos reportados para las especies de *Cryptosporidium*. (Cuadro 4). El mayor porcentaje de ooquistes correspondieron a la categoría II (47.3%), mientras que en menor proporción se encontraron los de la categoría I (7.8%). Cuadro 5

Discusión

El primer reporte de *Cryptosporidium sp.* en reptiles fue hecho en 1977 por Brownstein (citado por Dubey ¹), quien encontró infectadas a 14 serpientes de tres géneros y cuatro especies, en el presente estudio se encontraron infectadas cinco géneros y 12 especies. El porcentaje global de serpientes positivas en este estudio se considera alto, si lo comparamos con el 3% observado por Jacobson (citado por Dubey ¹) en 528 reptiles provenientes de tres continentes. ⁽¹⁾

La elevada frecuencia observada puede ser explicada en parte por el hecho de que los organismos examinados fueron de cautiverio y aunque cada serpiente tiene su propio albergue, en ciertos momentos tienen estrecha convivencia con otros especímenes de su especie, ya que en el laboratorio se realizan varios trabajos de reproducción y etología, por lo que es factible que exista transmisión horizontal durante este tipo de encuentros.

La criptosporidiosis es una causa considerable de morbilidad y eliminación de especímenes, por muerte natural o eutanasia obligatoria,⁽¹³⁾ aunque de acuerdo con Upton,⁽³⁾ Graczyk y Crandfiel,⁽¹⁶⁾ la mayoría de los casos de criptosporidiosis clínica en reptiles ocurre en animales cautivos. En el presente estudio, solo en una serpiente (*Crotalus molossus*) se observó inflamación de la región gástrica y regurgitación. Al respecto Grajales¹ sugirió, que las especies venenosas son más susceptibles de desarrollar la enfermedad clínica debido a que son más propensas al estrés.

En serpientes que son muy nerviosas como las del género *Crotalus* y *Elaphe*, se ha observado una mayor incidencia de cambios patológicos. ⁽⁹⁾

¹ MVZ. Luis Grajales Tam. Comunicación personal. 2007

Se observó una mayor frecuencia de serpientes positivas a *Cryptosporidium* sp. en las especies inofensivas que en las venenosas, sin embargo, no se encontraron referencias bibliográficas para comparar esta información.

Es importante reconocer que mamíferos y aves infectadas con *Cryptosporidium* pueden ser una fuente pasiva de ooquistes que se trasladan por el tracto gastrointestinal y aunque la serpiente no se infecte, estos ooquistes pueden ser detectados en las heces de las serpientes. ⁽⁷⁾ Durante el examen de las muestras, se observaron diferentes morfotipos de ooquistes compatibles con *C. parvum*, *C. muris*, *C. saurophilum* y *C. serpentis*, lo cual refuerza lo mencionado anteriormente por Graczyk y Crandfield. ⁽⁷⁾

En el cuadro 4 se aprecian las medidas promedio y rango de diferentes especies de *Cryptosporidium* que podrían encontrarse en las heces de serpientes, de acuerdo con esta información, de los ooquistes observados en las serpientes del laboratorio de herpetología, el 7.8% (categoría I), podrían corresponder a *C. parvum* o *C. saurophilum*, el 47.3% (categoría II), a *C. serpentis*, el 31.5% (categoría III) a *C. muris* y el 15.7% (categoría IV), a otra especie. Debido a que es difícil precisar las especies mediante microscopía convencional, se recomienda que a los animales positivos se les realice otras pruebas basadas en ADN para saber que especie es la que se encuentra en el individuo.

En este estudio se colectaron muestras seriadas hasta en 7 ocasiones con el objetivo de disminuir el número de falsos negativos; 31 serpientes fueron positivas en su primer muestreo, 5 en la segunda muestra, 2 en la tercera

colecta. Por otra parte, en 32 serpientes no se encontraron ooquistes en los siete exámenes. Lo anterior coincide en lo general con Graczyk y Crandfield ⁽¹⁶⁾ donde recomienda que se realicen al menos 7 exámenes para descartar falsos negativos.

Debido a que frecuentemente se adquieren nuevos organismos para la colección del laboratorio de herpetología de la FES Iztacala, existe la posibilidad de que ingresen animales portadores de este parásito, por lo que se sugiere que además de cuarentenar a los nuevos ejemplares, se les realicen análisis de muestras fecales y de ser portadores de *Cryptosporidium* sp. se evalúe su aceptación.

REFERENCIAS

1. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Florida: CRC Press, 1990.
2. Xiao L, Ryan UM, Graczyk TK, Cranfield R. Genetic diversity of *Cryptosporidium spp.* In captive reptiles. *Appl Environ Microbiol* 2004;70: 891-899.
3. Upton SJ, McAllister CT, Freed PS, Bernard SM. *Cryptosporidium spp.* In wild and captive reptiles. *J Wild Dis* 1989;25:20-30.
4. Graczyk TK, Cranfield R. Experimental infection of elapid snakes with *Cryptosporidium serpentis*. *J Parasitol* 1994;5:823-82.
5. Fowler ME. *Zoo and Wild Animals Medicine*. 5th ed. Missouri: Saunders, 1999.
6. Bernard SM, Upton SJ. *A veterinary guide to the parasites of reptiles*. Florida: Krieger, 1994.
7. Graczyk TK, Cranfield MR. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Vet Res* 1998;29:187-195.
8. Graczyk TK, Cranfield MR. Multiple *Cryptosporidium serpentis* oocyst isolates from captive snakes are not transmissible to amphibians. *J. Parasitol* 1998;84:1299-1301.
9. Graczyk TK, Cranfield MR. *Manual of reptile Medicine and Surgery*. 2nd ed. Missouri: Saunders, 2006.

10. Frye. Biomedical and Surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd ed. Florida: Krieger, 1991.
11. Brownstein DG, Strandberg JD, Montalt RJ. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. Vet Pathol 1977;14: 606-617.
12. Bernard SM, Upton SJ. A veterinary guide to the parasites of reptiles. 2nd ed. Florida: Krieger, 2002.
13. Graczyk TK, Cranfield R. Assessment of the conventional detection of fecal *Cryptosporidium serpentis* oocysts in subclinically infected captive snakes. Vet Res 1996;27:185-192.
14. Girling SM, Raiti P. Manual of reptiles. 2nd ed. England: British Small Animal Veterinary Association 2004.
15. Graczyk TK, Cranfield R, Mader WB. Manual of reptile Medicine and Surgery. Missouri: Saunders 1996.
16. Graczyk TK, Cranfield R, Owens R. Diagnosis of subclinical cryptosporidiosis in captive snakes based on stomach lavage and cloacal sampling. Vet Parasitol 1996;67:143-151.
17. Graczyk TK, Cranfield R. Detection of *Cryptosporidium* specific serum immunoglobulins in captive snakes by a polyclonal antibody in the indirect ELISA. Vet Res 1997;28:131-142.
18. Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R. A comparative assessment of direct fluorescence antibody, modified acid-fast stain, and sucrose flotation techniques for detection of *Cryptosporidium serpentis* oocysts in snake fecal specimens. J Zoo Wild Med 1995;26:396-402.

19. Graczyk TK, Cranfield MR. Successful hyperimmune bovine colostrum treatment of savanna monitors (*Varanus exanthematicus*) infected with *Cryptosporidium* sp. J. Parasitol 2000;86:631-632.
20. Graczyk TK, Cranfield MR, Helmer P. Therapeutic efficacy of hyperimmune bovine colostrum treatment against clinical and subclinical *Cryptosporidium serpentis* infections in captive snakes. Vet Parasitol 1998;74:123-132.
21. Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP. Herpetology An Introductory Biology of amphibians and Reptiles. 2nd ed. Florida: Academic Press, 2001.
22. Velasco PD. Procedimiento de manejo, transporte y uso de materiales de referencia en el laboratorio. En Manual de procedimientos de laboratorio del curso: Técnicas de colección, conservación y tinción para diagnóstico de parásitos en animales domésticos. México D.F: FMVZ-UNAM, 2005.

CUADROS

Cuadro 1. Organismos del Laboratorio de herpetología de la FES Iztacala examinados

Nombre científico	Categoría	Examinados	%
<i>Agkistrodon bilineatus bilineatus</i>	Veneno	14	20
<i>Boa constrictor imperator</i>	Inofensivo	17	24,3
<i>Bothrops asper</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus atrox</i>	Veneno	2	2,8
<i>Crotalus lepidus klauberi</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus molossus</i>	Veneno	7	10
<i>Crotalus scutulatus</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus scutulatus salvini</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus simus culminatus</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus triseriatus</i>	Veneno	1	1,4
<i>Crotalus viridis</i>	Veneno	1	1,4
<i>Elaphe guttata</i>	Inofensivo	1	1,4
<i>Masticophis mentovarius</i>	Inofensivo	2	1,8
<i>Pituophis deppei deppei</i>	Inofensivo	17	24,3
<i>Pituophis melanoleucus sayi</i>	Inofensivo	2	1,8
<i>Trimorphodon biscutatus</i>	Veneno	1	1,4
Total		70	97,6

Cuadro 2. Frecuencia de serpientes positivas a ooquistes de *Cryptosporidium* en el Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala. Distribución por género.

Género	Número examinados	%	Núm. Positivos	% positivos	IC 95%
<i>Agkistrodon</i>	14	20	1	1,4	0,25 a 7,65
<i>Boa</i>	17	24,2	11	15,7	9 a 25,98
<i>Bothrops</i>	1	1,4	0	0	-
<i>Crotalus</i>	15	21,4	11	15,7	9 a 25,98
<i>Elaphe</i>	1	1,4	0	0	-
<i>Masticophis</i>	2	2,8	1	1,4	0,25 a 7,65
<i>Pituophis</i>	19	27,1	14	20	12,3 a 30,81
<i>Trimorphodon</i>	1	1,4	0	0	-
	70	99,7	38	54,2	42.6 a 65.4

Cuadro 3. Frecuencia de serpientes positivas a ooquistes de *Cryptosporidium* en el Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala. Distribución por su peligrosidad.

Organismo	Núm. examinados	Núm. positivos	%positivos	IC al 95%
Venenooso	31	12	17,1	10,08 a 27.61
Inofensivo	39	26	37,1	26,77 a 48,85
Total	70	38	54,2	

p=0.029

Cuadro 4. Medidas promedio y rango de ooquistes de *Cryptosporidium*

Especie	Promedio (μ)	Rango (μ)
<i>C. parvum</i>	5 x 4.5	4.5 – 5.4 x 4.2 – 5.0
<i>C. saurophilum</i>	5.0 x 4.7	4.4 - 5.6 x 4.2 - 5.2
<i>C. serpentis</i>	6.1 x 5.3	5.7 – 6.5 x 4.8- 5.5
<i>C. muris</i>	7.4 X 5.6	6.6 – 7.9 x 5.3 – 6.5

Fuente ^(3,4)

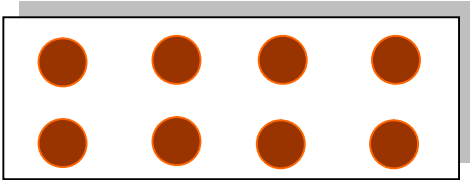
Cuadro 5. Tamaño de ooquistes de *Cryptosporidium* observados en las serpientes del Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala.

Dimensión de ooquistes (μ)	Frecuencia	Categoría	Porcentaje por categoría
5.0 x 4.0	1	I	7.8
5.5 x 4.5	1	I	
5.5 x 5.0	1	I	
6.0 x 4.0	4	II	47.3
6.0 x 4.5	4	II	
6.0 x 5.0	7	II	
6.0 x 5.5	1	II	
6.5 x 5.5	1	II	
6.5 x 6.0	1	II	
7.0 x 4.0	2	III	
7.0 x 4.5	1	III	
7.0 x 5.0	2	III	
7.0 x 5.5	1	III	
7.0 x 6.0	4	III	
7.5 x 6.0	1	III	
8.0 x 5.0	2	IV	15.7
8.0 x 6.0	4	IV	

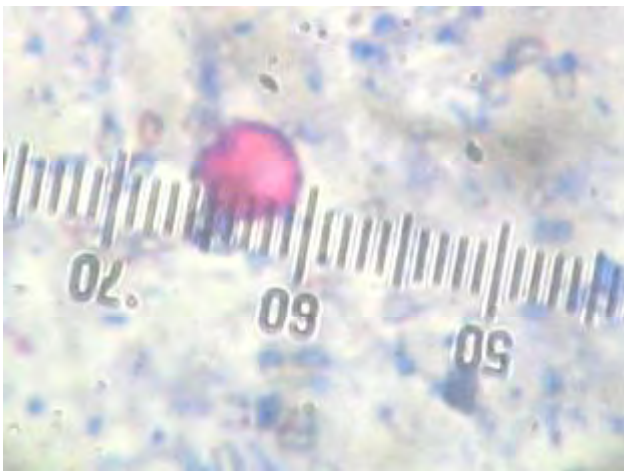
Imágenes



Imágen 1. Inflamación de la región gástrica, localizada en el segundo tercio del cuerpo. Tomada de: Graczyk TK, Cranfield MR. Manual of reptile Medicine and Surgery. Ed. Saunders 2006; 756-761. ⁽⁹⁾



Imágen 2.



Imágen 3. Ooquiste de *Cryptosporidium* sp. 100x, original