

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Diagnóstico serológico de Paramixovirus ofídico en serpientes en
cautiverio en Costa Rica**

**Tesis presentada para optar por el título de
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Realizada por: Cristina Solís Worsfold

Tutor: Carlos Jiménez Sánchez DMV, Dr. med vet.

Cotutor: Randall Arguedas Porras, DMV

Campus Presbítero Benjamín Núñez

Heredia, Costa Rica

2011

“Diagnóstico serológico de Paramixovirus ofídico en serpientes en cautiverio de Costa Rica”.

M.Sc. María Antonieta Corrales Angulo

Decana, Facultad de Ciencias de la Salud, UNA

Firma _____

Dr. Víctor Montenegro Hidalgo, DMV, Dr. med. vet.

Subdirector Escuela de Medicina Veterinaria

Firma _____

Dr. Carlos Jiménez Sánchez, DMV, Dr. med. vet.

Tutor

Firma _____

Dr. Randall Arguedas Porras, DMV.

Cotutor

Firma _____

Dr. Mario Baldi Salas, DMV, MSc.

Lector

Firma _____

DEDICATORIA

A mis padres, Luis Guillermo Solís y Nancy Worsfold, por su amor, apoyo incondicional y constante enseñanza.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a mis hermanos y familia por su apoyo en estos años de carrera. También a César Alfaro por todo el cariño y apoyo. A mis amigas y hermanas de carrera por su amistad incondicional.

Un especial agradecimiento a todos los cuidadores y dueños de las colecciones que me permitieron realizar este trabajo. A Aarón Gómez, Fabián Bonilla, y Santos Rodríguez del Instituto Clodomiro Picado; Rodolfo Vargas del Refugio Herpetológico de Costa Rica y Ricardo Jiménez; Luis Morales del Serpentario Móvil; Pompilio Campos padre e hijo de Snake Garden; Sergio Arguedas de Reptilia de Costa Rica; Robert Meidinger del Mundo de Serpientes, y Francisco Castro. Muchas gracias por su confianza en este proyecto.

A mi tutor el Dr. Carlos Jiménez por presentarme al mundo de la Virología y acompañarme cada paso de este proyecto. Al equipo del Laboratorio de Virología, la técnica Rocío Cortés, Lourdes Fuentes, y Pedro Morales por su apoyo e importante ayuda durante el proceso del proyecto.

A mi cotutor el Dr. Randall Arguedas por su gran ayuda en la toma de muestras, apoyo en el proyecto, aporte de su gran conocimiento, y amistad.

Al Dr. Mario Baldi por su ayuda como lector y aporte al proyecto.

A la Dra. Marcia Ramírez y al Dr. Carlos Zúñiga del Laboratorio de Patología Aviar, y la técnica Xindy Víquez por su gran ayuda en el proyecto con las aves.

Al Dr. Juan José Romero por su aporte al proyecto.

Al Dr. Juan Alberto Morales del Laboratorio de Patología por su ayuda con los casos clínicos.

A la Lic. Patricia González por su ayuda en los trámites para la compra del antígeno.

Al Biólogo José Alfredo Hernández del CONAGEBIO por su ayuda en los trámites con los permisos del MINAET.

Al Dr. Elliot Jacobson, Dr. Rolando Quesada, y Dra. April Childress de la Universidad de Florida por su ayuda.

A los estudiantes de Internado 2010-2011 que brindaron su ayuda con mi proyecto durante su rotación.

A todos los que de una forma u otra me ayudaron en el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue demostrar la presencia de anticuerpos contra el paramixovirus ofídico (PMVO) en el suero de 150 vipéridos, en cautiverio, ubicados en nueve establecimientos en Costa Rica, mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) utilizando, para tal fin, las cepas Bush Viper (BV) y Neotropical (NT) como antígeno. Ambas cepas fueron replicadas en células Vero y en huevos embrionados de pollo a temperatura de incubación de 28°C. Dos grupos de aves, tres aves en cada grupo, fueron inmunizadas con cada cepa con el fin de preparar antisueros específicos para ser utilizados como control positivo en la prueba de IHA. La interpretación de los resultados positivos se realizó de la siguiente forma: leves (1:20 a 1:80), moderados (1:160) y fuertes (>1:160). La seroprevalencia de anticuerpos específicos a PMVO fue de 26% (n=39) para la cepa BV y 28,6% (n=43) para la cepa NT. Además, se implementó la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba diagnóstica del PMVO complementaria a la IHA. Los datos de nuestra investigación demuestran por vez primera en Costa Rica evidencia serológica de la presencia de infecciones con dos cepas de PMVO en vipéridos mantenidos en cautiverio. Adicionalmente, se logró diagnosticar un caso clínico como positivo al virus por medio de PCR.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to demonstrate antibodies against the ophidian paramyxovirus (OPMV) in serum samples from 150 vipers belonging to nine captive collections in Costa Rica. A hemagglutination inhibition (HAI) assay was used to evidence antibodies against OPMV strains denominated Bush viper (BV) and Neotropical (NT). Each strain was replicated in Vero cells and in embryonated chicken eggs using an incubation temperature of 28°C. Two groups of three birds each were immunized with each strain respectively, in order to obtain specific antiserum to use as positive control in the HI test. The positive results were grouped as follows: low (1:20 to 1:80), moderate (1:160), and strong (>1:160). The seroprevalence toward specific OPMV antibodies were: 26% (n=39) for the BV strain and 28,6% (n=43) for the NT strain. Also, a polymerase chain reaction (PCR) technique was implemented as a complementary diagnostic test for the OPMV. Our data prove, for very first time in Costa Rica, serological evidence of infections with two strains of PMVO in vipers in captivity. Additionally, using PCR assay, we were able to relate a clinical affected case with OPMV disease.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	pág.
DEDICATORIA	0
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. Marco teórico	3
<i>1.2.1. Paramixovirus ofídico (PMVO)</i>	3
<i>1.2.2. Características del PMVO</i>	4
1.3. Objetivos	8
<i>1.3.1. Objetivo General</i>	8
<i>1.3.2. Objetivos Específicos</i>	8
2. METODOLOGÍA: MÉTODOS Y MATERIALES	9
2.1. Animales y establecimientos	9
2.2. Número de muestra	10
2.3. Colecta y manejo de la muestra de sangre	10
2.4. Antígenos	11
2.5. Replicación viral en cultivo celular	11
2.6. Replicación viral en huevo embrionado	11
2.7. Hemoaglutinación	12
2.8. Inmunización de aves	12
2.9. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)	13
2.10. Extracción de ARN, conversión a cDNA, prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1. Animales y establecimientos	16
3.2. Colecta y manejo de la muestras	18
3.3. Replicación viral en cultivo celular y huevo embrionado	19

3.4. Inmunización de aves	21
3.5. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)	24
3.5.1. <i>Prevalencia por establecimiento y porcentaje por grado de positividad</i>	24
3.5.2. <i>Prevalencia por especie de vipérido y porcentaje de positividad por grado</i>	28
3.5.3. <i>Desglose de los resultados positivos por cepa viral, establecimiento y especie</i>	31
3.6. Extracción de ARN, conversión a cDNA, prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis	42
4. CONCLUSIONES	46
5. RECOMENDACIONES	47
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7. ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS		pág.
Cuadro 1.	Genes virales del PMVO con la proteína codificada y su función.....	5
Cuadro 2.	Establecimientos visitados con su ubicación, y cantidad de vipéridos muestreados por género.....	17
Cuadro 3.	Cantidad de vipéridos muestreados por especie y nombre común.....	18
Cuadro 4.	Título de cada cepa de PMVO mediante hemoaglutinación por pasaje en células Vero.....	20
Cuadro 5.	Título de HA de fluido alantoideo de huevos embrionados según cepa..	21
Cuadro 6.	Título de anticuerpos (IHA) en suero de aves antes y después de la inmunización con dos cepas de PMVO.....	22
Cuadro 7.	Título de anticuerpos (IHA) en suero de aves utilizando las cepas de PMVO homólogas y heterólogas como antígenos.....	23
Cuadro 8.	Prevalencia por serpentario, y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa BV...	26
Cuadro 9.	Prevalencia por serpentario, y frecuencias absolutas y relativas de las muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa NT...	27
Cuadro 10.	Especie de vipérido y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa BV.....	29
Cuadro 11.	Especie de vipérido y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa NT.....	30
Cuadro 12.	Resultados positivos leves de la cepa BV por serpentario, número de identificación y especie.....	31
Cuadro 13.	Resultados positivos leves para la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.....	32
Cuadro 14.	Comparación de resultados positivos leves a ambas cepas.....	33
Cuadro 15.	Resultados positivos intermedios para la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.....	34

Cuadro 16.	Resultados positivos intermedio a la cepa NT por serpentario, número de identificación, y especie.....	35
Cuadro 17.	Comparación entre los positivos moderados de ambas cepas.....	35
Cuadro 18.	Resultados positivos fuertes a la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.....	36
Cuadro 19.	Resultados positivos fuertes a la cepa NT por serpentario, número de identificación, y especie.....	37
Cuadro 20.	Comparación de títulos positivos fuertes con las dos cepas.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la cepa BV mostrando cinco bandas de 153pb: primera banda virus original, segunda banda pasaje en huevo embrionado, tercera banda duplicado del pasaje en huevo embrionado, cuarta banda cultivo celular tercer pasaje, y quinta banda duplicado del cultivo celular tercer pasaje.....	43
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de la cepa NT mostrando tres bandas de 153pb: primera banda virus original, segunda banda pasaje en huevo embrionado, y tercera banda cultivo celular 3P. El último espacio corresponde al control negativo.....	43
Figura 3. Inclusiones características de Adenovirus en hígado de <i>Bothriechis schlegelii</i>	44
Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa, muestra #114: la primera banda corresponde al producto obtenido utilizando 2ul de cDNA, la segunda banda corresponde al control positivo utilizando el cDNA del virus original BV, y la tercera banda corresponde al producto obtenido empleando 5ul de cDNA.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACF: Adyuvante Completo de Freund

ARN: ácido ribonucleico

ATCC ®: American Type Culture Collection

BrEt: Bromuro de etidio

BSA: albúmina de suero de bovino

BV: Bush viper

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CONAGEBIO: Consejo Nacional de Biodiversidad

CPI: Consentimiento Previamente Informado

TCDI₅₀/ml: dosis infectantes medias en tejido celular por ml

IHA: Inhibición de la Hemoaglutinación

ICP: Instituto Clodomiro Picado

MINAET: Ministerio de Ambiente Energía y Telecomunicaciones

MS: Mundo de las Serpientes

NT: Neotropical

P1: Colección Privada 1

P2: Colección Privada 2

PBS: solución buferada de fosfatos

PCR: amplificación en cadena de la polimerasa

PF: Positivo fuerte

PL: Positivo leve

PM: Positivo moderado

PMVO: Paramixovirus ofídico

RCR: Reptilia de Costa Rica

RH: Refugio Herpetológico de Costa Rica

SFB: suero fetal bovino

SG: Snake Garden

SM: Serpentario Exhibición Cultural Móvil

UHA: Unidades hemoaglutinantes

ZSB: Zoológico Simón Bolívar

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas las colecciones de serpientes en cautiverio han aumentado dramáticamente y representan una de las poblaciones de reptiles con mayor crecimiento en países como Estados Unidos (Mader, 2006), Alemania (Pees et al., 2010), España (Orós et al., 2001), entre otros. En Costa Rica, los serpentarios se han utilizado como una atracción turística, al igual que centros de investigación y desarrollo de medicamentos, así como centros de educación ambiental (Arguedas, 2009).

Cada día, los serpentarios contienen más animales y hay mayor traslado de especies de un centro a otro, en algunos casos sin realizar una cuarentena adecuada del animal antes de ingresar a la colección. Asimismo, la importación y exportación de animales puede resultar en la mezcla de diferentes patógenos al presentar enfermedades nuevas a poblaciones susceptibles (Ritchie, 2006).

Las serpientes en cautiverio sufren de estrés e inmunosupresión por su captura, transporte, manejo constante y, en algunos casos, por ser colocadas en ambientes poco adecuados, disminuyendo así su resistencia natural a enfermedades (Coborn, 1987; Mattison, 1992). En situaciones de estrés se van a ver disminuidas la respuesta inflamatoria y la producción de anticuerpos en el reptil haciendo al animal más susceptible a la enfermedad (Denardo, 2006).

Los micro-parásitos, entre estos los virus, son considerados agentes potencialmente dañinos para las poblaciones de animales silvestres pues su efecto negativo se ha reportado en animales tanto en vida libre como en cautiverio (Essbauer & Ahne, 2001). Además, las enfermedades virales en el animal pueden predisponer a la entrada de otros patógenos

secundarios como son bacterias, hongos y parásitos, aumentando de esta manera la severidad del cuadro clínico (Ritchie, 2006; Jacobson, 2002). Una pérdida de individuos producto de enfermedades repercute como pérdida económica para los centros pues muchos de estos individuos son de alto valor económico y genético (Essbauer & Ahne, 2001).

Las enfermedades del sistema nervioso y respiratorio son comúnmente encontradas en los reptiles bajo condiciones de cautiverio y son responsables de pérdidas de individuos en colecciones privadas, de zoológico y en centros de investigación en diferentes países del mundo (Jacobson et al., 1992). Agente virales, como el Paramixovirus ofídico (PMVO), son los responsables de algunos casos (Jacobson et al., 1980; Jacobson et al., 1992).

Desde que el PMVO fue aislado por primera vez, se han documentado al menos diez brotes importantes en colecciones en diferentes países del mundo, destacando las colecciones en Suiza, Estados Unidos, Brasil, España, entre otros (Clark et al., 1979; Jacobson, et al., 1981; Orós et al., 2001). Dos de los brotes más relevantes se asociaron con la importación de serpientes procedentes del sudeste asiático y desde Costa Rica (Cranfield & Graczyk, 1996). No se encontró información relevante en lo referente a los animales exportados que resultaron infectados ni sobre los brotes ocurridos.

El único caso de mortalidad por PMVO reportado en Costa Rica se presentó en una serpiente en cautiverio en el año 2005. En el estudio histopatológico de los tejidos del animal se constató infección con el PMVO mediante una prueba de hibridación in-situ realizada al tejido pulmonar (Quesada, 2005; Morales, 2008). A pesar de lo anterior, se desconoce la situación epidemiológica del PMVO en serpientes de nuestro país.

1. 2. Marco teórico

1.2.1. *Paramixovirus ofídico (PMVO)*

El PMVO fue aislado por primera vez en 1972 a partir del tracto respiratorio de un vipérido brasileño *Bothrops moojeni* (Fer-de-lance) perteneciente a un serpentario en Suiza (Clark et al., 1979). El establecimiento reportó un cuadro respiratorio con una mortalidad del 25,0% de los 431 especímenes expuestos (Homer et al., 1995; Bronson, 2006; Kolesnikovas et al., 2006; Jacobson, 2007). Posterior a este se dio la identificación de este agente viral en colecciones de serpientes en cautiverio en los Estados Unidos, México, Brasil, Alemania, y España (Jacobson et al., 1992; Orós et al., 2001). La prevalencia del virus en animales de vida libre es desconocida pero se le considera una enfermedad emergente con efectos negativos en las poblaciones de vipéridos en sus ecosistemas (Kurath, 2004).

En los Estados Unidos entre los años 1980 y 1987, se reportaron, en colecciones de zoológicos del estado de Louisiana, dos brotes importantes causados por el PMVO, (Jacobson et al., 1981; Jacobson et al., 1992). En el primero 35 vipéridos murieron, afectando el 8,0% de la colección de 438 ejemplares. La morbilidad del virus no fue reportada (Jacobson et al., 1981). En el segundo, 128 serpientes se expusieron al virus debido a contacto con animales que fueron introducidos al serpentario sin un periodo de cuarentena adecuado. En un lapso de cinco meses, 35 de los 53 vipéridos de la colección murieron; 26 (49,0%) de las muertes fueron confirmadas como consecuencia del PMVO (Jacobson et al., 1992). En España se realizó un estudio retrospectivo donde se recolectaron muestras de tejidos de serpientes que habían muerto en diferentes colecciones de las Islas Canarias. A los tejidos se les realizaron exámenes inmunohistoquímicos y se reportaron seis muertes por PMVO (Orós et al., 2001). A

pesar de que se dispone de información sobre diversos brotes por PMVO, se desconoce la prevalencia de este agente en los países donde los brotes ocurrieron.

1.2.2. Características del PMVO

Como su nombre lo indica, taxonómicamente, el PMVO ha sido clasificado dentro de la familia *Paramyxoviridae*, la cual se ubica en el orden *Mononegavirales* y se subdivide en dos subfamilias *Paramyxovirinae*, con los géneros *Abulavirus*, *Henipavirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, y *Morbillivirus*; y *Pneumovirinae* con los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus* (Murphy et al., 1999). El PMVO no ha sido agrupado a ninguna subfamilia o género en particular. Los viriones del PMVO son pleomórficos con un diámetro de 150-300nm, envueltos, peplómeros de 8-20nm de longitud y nucleocápside helicoidal. El genoma es de ácido ribonucleico (ARN) y consiste de una sola molécula lineal con polaridad negativa, de 15.378 nucleótidos (Clark et al., 1979; Murphy et al., 1999; Kurath, et al., 2004). La organización y replicación del genoma del PMVO es similar a otros paramixovirus (Kurath et al., 2004), con excepción del gen U no presente en otros miembros de la familia (Murphy et al., 1999; Kurath et al., 2004). Este gen puede representar la base filogenética que permita ubicar al PMVO en un nuevo género (Kurath et al., 2004). El detalle y la función de las proteínas virales se presentan en el cuadro 1.

Basándose en los genes L y HN, diferentes estudios moleculares agrupan a los paramixovirus de reptiles en dos grandes grupos filogenéticos (A y B) y un grupo intermedio (I) los cuales son antigénicamente similares entre ellos y tienen baja especificidad de huésped (Ahne, 1999b). Por su secuencia, la cepa Neotropical (NT) se encuentra en el grupo I y la cepa Bush Viper (BV) ha sido agrupada en el grupo B (Kindermann, 2001). Estudios serológicos de

inhibición de la hemoaglutinación (IHA) reportan una reacción cruzada entre paramixovirus de reptiles y los paramixovirus aviaries serotipo 1 y 7 (Blahak, 1995).

Cuadro 1. Genes virales del PMVO con la proteína codificada y su función (Murphy et al., 1999).

Gen viral	Proteína viral codificada	Función
N	N	Formación de la nucleocápside.
U	U	Proteína de membrana, única en la familia <i>Paramixoviridae</i> .
P	P/V/I	Interviene en la replicación del genoma, la proteína V es accesoria y sirve para bloquear al interferón del huésped.
M	M	Proteína más abundante, asociada a las membranas.
F	F	Proteína de fusión de la envoltura del virus a la célula del huésped. Media la patogenicidad.
HN	HN	Media la unión del virus a los receptores glicolipídicos de la superficie celular
L	L	Polimerasa

El PMVO ha sido aislado en reptiles de las familias *Elapidae*, *Boidae*, *Colubridae*, y *Viperidae* (Sand et al., 2004; Bronson, 2006; Jacobson, 2007). La infección puede transcurrir de forma peraguda, aguda, crónica o subclínica (Aguilar et al., 2005; Bronson, 2006). Los signos clínicos asociados con la enfermedad no son patognomónicos (Sand et al., 2004; Bronson, 2006) e incluyen: anorexia, regurgitación ocasional, disnea aguda, estridor, emaciación, desgaste muscular, diarrea mucoide, temores de la cabeza, falta de equilibrio, opistótonos, parálisis flácida aguda, enfermedad progresiva del sistema nervioso central, convulsiones terminales, y/o posicionamiento anormal de la cabeza (Jacobson et al., 1980;

Jacobson et al., 1981; Jacobson et al., 1991; Jacobson et al., 1992; West et al., 2001; Marschang & Chitty, 2004; Sand et al., 2004; Bronson, 2006; Jacobson, 2007). Los hallazgos histopatológicos de serpientes afectadas por el PMVO incluyen neumonía proliferativa intersticial, encefalitis, necrosis pancreática, entre otros (Jacobson et al., 2007 ; Kolesnikovas et al., 2006). Los animales también pueden ser encontrados muertos sin ninguna sintomatología previa o pueden morir desde una semana hasta meses luego de haber sido expuestos al virus (Bronson, 2006; Kolesnikovas et al. 2006).

Este virus puede ser transmitido por secreciones nasales y descargas hemorrágicas mucopurulentas de la glotis infectando rápidamente a las serpientes que entran en contacto con ellas (Jacobson et al., 1997; Francisco et al., 2001; Mitchell, 2003; Bronson, 2006). También puede presentarse la infección en animales en contacto con fómites y jaulas contaminadas (Bronson, 2006).

El PMVO es inmunosupresor por lo tanto los animales mueren de enfermedad bacteriana secundaria por organismos gram-negativos principalmente (Jacobson et al., 1981; Jacobson et al., 1991; Jacobson et al., 1992; Bronson, 2006; Kolesnikovas et al., 2006). Durante una epidemia se debe reducir el contacto entre serpientes infectadas y sanas lo más rápido posible ya que no existe un tratamiento específico contra el virus (Jacobson et al., 1981; Jacobson et al., 1992; Bronson, 2006). La administración de antibióticos de amplio espectro, para minimizar la neumonía bacteriana secundaria en las serpientes afectadas, disminuye la mortalidad en algunos casos (Jacobson et al., 1980; Jacobson et al., 1981; Jacobson et al., 1991; Bronson, 2006).

Las medidas de bioseguridad son necesarias para disminuir el riesgo de infecciones en las colecciones manteniendo así un buen estado sanitario de las serpientes (Bronson, 2006). La

prevención del contagio de enfermedades se logra realizando un periodo de cuarentena de los animales nuevos de al menos 90 días y hasta seis meses antes de ser introducidos a la colección (Coborn, 1987; Marschang & Chitty, 2004; Rossi, 2006; Bronson, 2006).

El diagnóstico de las infecciones por PMVO puede ser difícil en algunos casos, ya sea por la falta de signos clínicos o por la ausencia de lesiones histopatológicas en el animal (Sand et al., 2004), sin embargo, el diagnóstico presuntivo puede realizarse basándose en la historia de exposición al virus y los hallazgos clínicos (Bronson, 2006).

Para realizar el diagnóstico definitivo se debe acudir a diversas pruebas de laboratorio, que permitan la identificación del agente causal, tales como el aislamiento viral en cultivos celulares o huevos embrionados a partir de muestras de hisopados orales y/o cloacales (Heard et al., 2004), identificación de antígenos virales mediante inmunoperoxidasa (Jacobson, 2007), inmunofluorescencia (Jacobson et al., 1997), o la detección del genoma viral mediante hibridación *in situ* o mediante la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) (Mitchell, 2003; Sand et al., 2004; Heard et al., 2004; Aguilar et al., 2005; Bronson, 2006; Jacobson, 2007). También se puede confirmar el diagnóstico poniendo en evidencia los anticuerpos específicos al PMVO mediante IHA o ELISA (Kania et al., 2000). La seroconversión ocurre entre 6 a 10 semanas post-infección por lo tanto los animales con enfermedad aguda podrían tener o carecer de anticuerpos detectables (Heard et al., 2004; Bronson, 2006).

Un animal que sobrevive una infección activa puede continuar eliminando el virus por períodos variables de tiempo, sin que necesariamente la infección persista de por vida, pero convirtiéndose así, temporalmente, en una fuente de infección para otras serpientes (Jacobson & Origgi, 2007).

1.2.2. Familia Viperidae

La familia *Viperidae* se compone de 245 especies distribuidas en 32 géneros. En Costa Rica se encuentran 16 especies en tres subdivisiones informales: Agkistrodontines (*Agkistrodon*), Crotalines (*Crotalus*), y Lachesines (*Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Lachesis*, y *Porthidium*) (Savage, 2002; Solórzano, 2004). Su tamaño varía de 50cm hasta 3m en algunos casos, y se diferencian por sus dos colmillos retráctiles en la parte anterior de la maxila (dentadura solenoglifa), los cuales conducen veneno necrótico y hemolítico. Se caracterizan por tener cuerpo robusto, con la cabeza ancha y bien diferenciada del cuello. Presentan un órgano termoreceptor especializado entre la fosa nasal y el ojo, llamado foseta loreal, que es utilizado para su alimentación y defensa. Su alimentación consiste de vertebrados pequeños e invertebrados y suelen ser de hábitos nocturnos y terrestres (Savage, 2002; Solórzano, 2004)

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos contra el PMVO en serpientes en cautiverio en Costa Rica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Implementar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico de anticuerpos específicos al PMVO en suero de serpientes mantenidas en cautiverio en Costa Rica.
- Establecer la seroprevalencia del PMVO por género taxonómico y por establecimiento.
- Cuantificar los casos positivos y negativos de la población muestreada.

2. METODOLOGÍA: MÉTODOS Y MATERIALES

2.1. Animales y establecimientos

Todos los animales muestreados pertenecen a la Familia *Viperidae*. El muestreo se realizó en el período comprendido entre setiembre de 2009 y febrero de 2011 durante el cual se visitaron nueve serpentarios a nivel nacional. El propietario o encargado de cada establecimiento fue informado previamente sobre la naturaleza del proyecto y del procedimiento que se iba a realizar con los animales. Un Consentimiento Previamente Informado (CPI) del Consejo Nacional de Biodiversidad (CONAGEBIO), el cual pertenece al Ministerio de Ambiente Energía y Telecomunicaciones (MINAET), fue revisado por los encargados y el permiso de investigación fue adquirido por medio de la resolución R-011(bis)-2010-OT-CONAGEBIO para el Instituto Clodomiro Picado, por medio de la resolución R-013-2010-OT-CONAGEBIO para Snake Garden, y por medio de la resolución R-012-2010-OT-CONAGEBIO para el Serpentario Exhibición Cultural Móvil, con el fin de cumplir con la Ley de Biodiversidad N°7788. El Zoológico Simón Bolívar no requirió permiso ya que forma parte del MINAET.

Los establecimientos visitados fueron: Instituto Clodomiro Picado (ICP), Refugio Herpetológico de Costa Rica (RH), Reptilia de Costa Rica (RCR), Zoológico Simón Bolívar (ZSM), Serpentario Exhibición Cultural Móvil (SM), Snake Garden (SG), Colección Privada 1 (P1), Mundo de las Serpientes (MS), y Colección Privada 2 (P2). Los animales muestreados debían ser de la familia *Viperidae* y tener un tamaño adecuado que permitiera el sangrado de su vena coccígea ventral o de su corazón.

2.2. Número de muestra

Un total de 150 animales fueron seleccionados como número mínimo para poder realizar los análisis de esta investigación y poder contar con datos estadísticamente significativos. A partir de una población estimada de 500 animales en cautiverio, la muestra permite determinar prevalencias inferiores o superiores al 25% y 75% respectivamente, con un 95% de confianza y un 6% de error aceptado. El cálculo del tamaño de muestra se realizó con el programa WinEpiscope (Thrusfield, M. et al., 2001).

2.3. Colecta y manejo de la muestra de sangre

La obtención de las muestras de sangre se realizó a partir de la vena coccígea ventral o mediante punción intracardiaca (Redrobe & MacDonald, 1999; Heard et al., 2004; Campbell & Ellis, 2007). La superficie corporal del sitio de venopunción de los animales, inmovilizados y sujetos por los encargados del establecimiento, fue desinfectada con un antiséptico quirúrgico (Redrobe & MacDonald, 1999; Francisco et al., 2001) y la punción se realizó con equipo estéril apropiado para la especie, tamaño del animal y volumen de sangre a obtener (Jacobson & Origgi, 2007; Campbell & Ellis, 2007). La muestra de sangre se colocó en un tubo sin anticoagulante o en un vial Eppendorf de 1,8ml, en posición vertical, y se dejó coagular por una hora a temperatura ambiente hasta que se retrajo el coágulo. Posteriormente se trasladó en una hielera al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria, donde se centrifugó a 4.000rpm durante cinco minutos y se separó el suero con una pipeta Pasteur. El suero se almacenó en un vial estéril a -20°C (Meneses, 1993; Jacobson & Origgi, 2007). De cada animal se obtuvo al menos 0,1ml de suero para realizar la prueba de IHA (Bronson, 2006).

2.4. Antígenos

Como antígeno de referencia de PMVO se adquirió, en la American Type Culture Collection (ATCC®-USA), la cepa Neotropical (NT) (número de catálogo VR-1408™) originalmente aislada de una *Crotalus simus*, y la cepa Bush viper (BV) (número de catálogo VR-1409™) aislada de una *Atheris squamiger*. Una vez en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria fueron divididas en alícuotas de 100ul y almacenadas a -70°C.

2.5. Replicación viral en cultivo celular

La replicación viral en cultivo celular de ambas cepas, NT y BV, se realizó en la línea celular Vero, a 28°C siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Mayr et al., 2000). Los cultivos fueron observados diariamente para determinar el efecto citopático y congelados a -70°C al día seis o siete post-inoculación. Posteriormente fueron descongelados, clarificados mediante centrifugación y se repitió el proceso de inóculo en las células Vero. En total se realizaron tres pasajes en cultivo celular para la cepa BV y cuatro pasajes con la cepa NT. La actividad viral presente en el medio de cultivo de cada pasaje fue monitoreada mediante la técnica de hemoaglutinación como se describe posteriormente en 2.7.

2.6. Replicación viral en huevo embrionado

La replicación viral de ambas cepas con la técnica de huevo embrionado se realizó en huevos fértiles de nueve días de edad, provenientes de una compañía nacional (Allan et al., 1980; Herrero & Hun, 1995) mediante inoculación del saco alantoideo siguiendo el procedimiento descrito por Ahne et al. (1999a).

En total se utilizó 5 huevos, dos fueron inoculados con la cepa NT, dos con la cepa BV y uno se empleó como control. La incubación se realizó a 28°C durante seis días, tras los cuales se cosechó los fluidos alantoideos y se observó cuidadosamente los embriones. La actividad viral presente en el fluido fue monitoreada mediante la técnica de hemoaglutinación como se describe a continuación.

2.7. Hemoaglutinación

La titulación viral mediante hemoaglutinación se realizó en placas de 96 pozos con fondo en V (Greiner, Ref 651101). En resumen, se colocó 50ul de solución buferada de fosfatos (PBS) en cada pocito de la placa, excepto en la primera fila donde se colocaron 100ul de los antígeno obtenidos en 2.5 y 2.6. Se realizaron diluciones con la ayuda de una pipeta multicanal (Eppendorf cat. 022452088) y se agregó 50ul de una suspensión de eritrocitos de pollo al 1% (10ml de PBS, 100ul de SFB, y 100ul de eritrocitos empacados). Se incubó a 4°C durante media hora y se procedió a la lectura (Herrero & Hun, 1995).

2.8. Inmunización de aves

A efecto de contar con sueros control para la IHA, tanto positivos como negativos, específicos a las cepas de referencia de PMVO (Jacobson & Origgi, 2007) y aprovechando la adaptación de ambos virus al sistema de huevo embrionado, tres aves de cuatro semanas de edad fueron inmunizadas con la cepa BV, tres con la cepa NT y tres sirvieron de control negativo.

Las aves, convencionales, de la raza Cobb fueron proporcionadas por una empresa nacional, se recibieron al día de edad, sin vacunas, y fueron ubicadas en jaulas de aislamiento

dentro de las instalaciones del Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria. La inmunización de las aves se realizó mediante inyección intramuscular a nivel de la pechuga con 0,5ml de una emulsión preparada con 1ml del fluido alantoideo de cada cepa, recuperado de los huevos embrionados, y 1ml de Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Carlander et al., 1999; Tizard, 1995; Hodek & Stiborová, 2003). La inmunización se repitió una vez más, sin el adyuvante de Freund, después de 12 días (Tijssen, 1985; Carlander et al., 1999; Hodek & Stiborová, 2003), empleando 0,5ml de fluido alantoideo, administrado de forma IM, y 0,5ml del tercer pasaje del cultivo celular de cada cepa, de forma IV.

Previo al procedimiento de inmunización, se colectó una muestra de sangre de cada ave y se analizó, mediante ELISA (Idexx® y BioCheck®), para detectar anticuerpos a Virus de Newcastle, Virus de Bronquitis Infecciosa, Virus de la enfermedad de Gumboro, Virus de Laringotraqueítis infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Los sueros hiperinmunes se obtuvieron mediante punción de las venas cutánea cubital y safena a la edad de 65 días, en que las aves fueron sometidas a eutanasia. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora, luego se centrifugó y el suero fue almacenado en alícuotas a -20°C (Tijssen, 1985) hasta su análisis mediante la prueba de IHA utilizando el antígeno específico de cada cepa.

Se contó con la aprobación del Comité de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV-CBA-010-2010) para realizar este procedimiento.

2.9. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

La detección y cuantificación de anticuerpos específicos a las dos cepas de referencia del PMVO se realizó mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA). En

forma resumida, los sueros, tanto de las serpientes como de las aves inmunizadas, fueron descongelados e inactivados a 56°C durante 30 minutos. Luego fueron diluidos en una proporción 1:5 en solución salina buferada con fosfatos (PBS) y adsorbidos con eritrocitos de pollo, lavados y empacados, durante 12 horas a 4°C para remover aglutininas inespecíficas (Herrero & Hun, 1995; Jacobson & Origgi, 2007). Posteriormente, se agregó un volumen de 25ul de PBS con 0,1% de albúmina de suero de bovino (BSA, Sigma cat. A 9418) conteniendo 8 unidades hemoaglutinantes (UHA) del antígeno PMVO a las placas de microtítulo. Luego se agregaron 25ul de suero por duplicado y se diluyeron en base 2. Cada dilución se incubó a temperatura ambiente durante una hora, tras la cual se agregó 25ul de una suspensión de eritrocitos de pollo al 1%. Luego las placas de microtítulo se incubaron a 4°C durante 30 minutos y después se procedió a la lectura de los resultados. El título de anticuerpos se estimó como la dilución más alta donde se encontró inhibición de la hemoaglutinación (Mohanty & Dutta, 1981 ; Herrero & Hun, 1995; Jacobson, 2002; Jacobson & Origgi, 2007).

En el presente estudio se clasificaron los positivos en tres categorías: positivos leves, moderados y fuertes. Un resultado de positivo leve correspondió con títulos de 1:20 a 1:80 (Jacobson et al., 1991; Allender et al., 2006; Kolesnikova et al., 2006; Knotek et al., 2007; Allender et al, 2008; Pees et al., 2010); el positivo moderado correspondió con un título de 1:160 (Allender et al., 2006; Allender et al 2008); y el positivo fuerte correspondió con los títulos mayores a 1:160 (Allender et al., 2006; Allender et al., 2008). Un resultado fue considerado negativo cuando los títulos fueron iguales o menores a 1:10 (Jacobson et al., 1991; Allender et al., 2006; Kolesnikova et al., 2006; Allender et al, 2008; Pees et al., 2010).

2.10. Extracción de ARN, conversión a cDNA, prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

La prueba de PCR se utilizó para identificar las dos cepas de virus original enviado por la ATCC®, el fluido alantoideo extraído de los huevos embrionados, y el tercer pasaje de cultivo celular utilizado para realizar la prueba de IHA. Se extrajo el ARN de las muestras utilizando las columnas de QIAamp® MiniElute Virus Spin Kit (Quiagen, cat. 57704). La retrotranscripción para el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se realizó utilizando el kit Revert Aid™ (Fermentas, cat. K1632).

Los primers utilizados para realizar el PCR fueron sintetizados por la compañía Invitrogen®. El producto esperado fue de 153 bp y la secuencia del primer de iniciación utilizado fue 5'-CGGATCTTATTCCTAGGGTA-3' y la del primer reverso 5'-TGATGCAGTTGACTATCTGC-3' (Sand et al., 2004). Para la cepa Bush Viper se utilizaron 25ul de Master Mix, 1ul de cada primer, 2ul de cDNA de cada muestra y 21ul de H₂O libre de nucleasas. Para la cepa Neotropical se modificó la cantidad de cDNA ya que se utilizaron 5ul y 18ul de H₂O libre de nucleasas. El protocolo de amplificación utilizado fue de 94°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por un minuto, 50°C por un minuto de anillamiento del primer, y 68°C por tres minutos de extensión. La extensión final fue de 10 minutos a 68°C seguido por 4°C tiempo infinito. La electroforesis se realizó utilizando un gel de agar al 1,5% con bromuro de etidio (BrEt) a 80v durante una hora en una cámara de electroforesis (BioRad® Mini-sub Cell GT). Los productos fueron visualizados en un transiluminador (Fotodyne, Pat USA, 4.657.655) y fotografiados (BioRad® Universal Hood II).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Animales y establecimientos

Un total de 150 muestras de suero de vipéridos fueron recolectadas en nueve serpentarios en cuatro provincias de Costa Rica (Cuadros 2 y 3). Con excepción del Mundo de las Serpientes, en el resto de los establecimientos se muestreó, al menos, el 25% de los vipéridos de la colección al momento de la visita (Thrusfield et al., 2001)

Los establecimientos se ubican en San José (n=5), Heredia (n=2), Alajuela (n=1), y Cartago (n=1). La mayor cantidad de muestras proviene del ICP (n=65), seguido de MS (n=16), SG (n=13), el ZSB, SM, y P2 (n=11), RCR (n=10), P1 (n=8), y por último RH (n=5). En el anexo 1 se detalla la identificación de cada muestra, su especie y el serpentario de origen.

La especie con mayor cantidad de muestras fue *Crotalus simus* (38,0%), seguido de *Bothrops asper* (26,7%), *Bothriechis lateralis* (10,0%), *Bothriechis schlegelii* (8,0%), *Atropoides picadoi* (4,6%), *Crotalus adamanteus* (3,3%), *Cerrophidion godmani* (2,7%), *Lachesis stenophrys* (2,7%), *Crotalus vegrandis* (2,0%), *Atropoides mexicanus* (2,0%) y *Porthidium nasutum* (0,7%) (Cuadro 3).

Los géneros muestreados fueron *Atropoides* spp., *Bothrops* spp., *Bothriechis* spp., *Cerrophidion* spp., *Crotalus* spp., *Lachesis* spp. y *Porthidium* spp., representando once especies diferentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Establecimientos visitados con su ubicación, y cantidad de vipéridos muestreados por género.

Establecimiento	Provincia	Número de muestras (%)	Géneros de vipéridos muestreados (n)
Instituto Clodomiro Picado (ICP)	San José	65 (43,4%)	<i>Bothrops</i> spp. (23) <i>Crotalus</i> spp. (42)
Refugio Herpetológico de C.R. (RH)	San José	5 (3,3%)	<i>Bothrops</i> spp. (3) <i>Crotalus</i> spp. (2)
Reptilia de C.R. (RCR)	Heredia	10 (6,6%)	<i>Atropoides</i> spp. (1) <i>Bothriechis</i> spp. (6) <i>Lachesis</i> spp. (3)
Zoológico Simón Bolívar (ZSM)	San José	11 (7,3%)	<i>Bothriechis</i> spp. (8) <i>Crotalus</i> spp. (1) <i>Cerrophidion</i> sp.(2)
Serpentario Exhibición Cultural Móvil (SM)	San José	11(7,3%)	<i>Atropoides</i> spp. (2) <i>Bothriechis</i> spp. (2) <i>Cerrophidion</i> spp. (2) <i>Crotalus</i> spp. (5)
Snake Garden (SG)	Heredia	13 (8,7%)	<i>Atropoides</i> spp. (4) <i>Bothriechis</i> spp. (1) <i>Bothrops</i> spp. (6) <i>Crotalus</i> spp. (2)
Colección privada (P1)	Cartago	8 (5,3%)	<i>Bothriechis</i> spp. (8)
Mundo de Serpientes (MS)	Alajuela	16 (10,6%)	<i>Atropoides</i> spp. (1) <i>Bothrops</i> spp. (4) <i>Crotalus</i> spp. (10) <i>Lachesis</i> spp. (1)
Colección privada (P2)	San José	11 (7,3%)	<i>Atropoides</i> spp. (1) <i>Crotalus</i> spp. (5) <i>Bothrops</i> spp. (2) <i>Bothriechis</i> spp. (2) <i>Porthidium</i> spp. (1)
Total		150 (100%)	

Cuadro 3. Cantidad de vipéridos muestreados por especie y nombre común.

Especie de vipérido	Nombre común	Cantidad de Muestras (n)
<i>Atropoides mexicanus</i>	Mano de piedra	1,3% (2)
<i>Atropoides picadoi</i>	Mano de piedra	4,6% (7)
<i>Bothrops asper</i>	Terciopelo	26,7% (40)
<i>Bothriechis lateralis</i>	Lora	10,0% (15)
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Bocaracá	8,0% (12)
<i>Cerrophidion godmani</i>	Toboba de altura	2,7% (4)
<i>Crotalus adamanteus</i>	Cascabel	3,3% (5)
<i>Crotalus simus</i>	Cascabel	38,0% (57)
<i>Crotalus vegrandis</i>	Cascabel	2,0 % (3)
<i>Lachesis stenophrys</i>	Matabuey	2,7% (4)
<i>Porthidium nasutum</i>	Tamagá	0,7% (1)
Total		100% (150)

3.2. Colecta y manejo de la muestras

Referente al procedimiento de colecta de sangre, conviene resaltar que la técnica intracardiaca sólo fue utilizada en tres animales ya que sus colas eran demasiado pequeñas para permitir el sangrado de su vena coccígea. No se presentaron complicaciones en los animales luego de la toma de muestra. En especies pequeñas como las del género *Bothriechis* se tomó aproximadamente de 0,5 a 1ml de sangre mientras que en especies más grandes como las del género *Crotalus* se tomó de 1 a 3ml de sangre. La vena coccígea en las especies *Crotalus* es más grande y fácil de ubicar por la irrigación de su cascabel.

En algunos casos las muestras de sangre se contaminaron con fluido linfático pero esto no afecta el resultado de los exámenes serológicos (Campbell, 2006). El suero usualmente fue de color amarillo claro pero en algunos casos presentó un color verde-amarillento posiblemente debido a presencia de riboflavina y carotenoides presentes en la sangre de

algunos animales (Campbell, 2006). Una vez colectadas las muestras de sangre se incubaron a temperatura ambiente durante, al menos, una hora debido a que en los reptiles la coagulación se prolonga por tiempo indefinido ya que tienen una baja actividad de la tromboplastina intrínseca además de un factor antitrombo natural (Campbell, 2006).

3.3. Replicación viral en cultivo celular y huevo embrionado.

Ambas cepas del PMVO pudieron ser replicadas en cultivos de células Vero utilizando medio de mantenimiento con antibiótico, antimicótico, y suero fetal bovino (SFB) 1% a una temperatura de 28°C (Childress, 2010).

Tras su ingreso al país, las dos cepas del PMVO se mantuvieron en la aduana a 4°C por varios días antes de ser retiradas. Esto pudo haber afectado el título de las mismas ya que la temperatura óptima para su almacenamiento es de -70°C (ATCC®, 2010). Según el proveedor, el título de la cepa BV era de 1:512 pero al titularla en el laboratorio su título fue de 1:32 el cual se mantuvo hasta su tercer pasaje. Por otra parte, el mismo proveedor reportó un título de $10^{4.5}$ dosis infectantes medias en tejido celular por ml (TCDI₅₀/ml) para la cepa NT y al titularla en el laboratorio se obtuvo 256 UHA. Al hacer los pasajes en cultivo celular con esta cepa no se pudo alcanzar el título del virus original (Cuadro 4).

La replicación de ambas cepas en cultivo celular se evidenció con la aparición de efecto citopático, células redondas, sincitios y lisis celular, a partir del quinto día post-inoculación.

En el cuadro 4 se presenta el comportamiento de ambas cepas en cultivo celular y su título mediante la técnica de hemoaglutinación.

Cuadro 4. Título de cada cepa de PMVO mediante hemoaglutinación por pasaje en células Vero.

Cepa PMVO	Pasaje en Células Vero	Título del virus
Bush Viper	Virus original	1:32
	1°	1:16
	2°	1:32
	3°	1:32
Neotropical	Virus original	1:256
	1°	1:8
	2°	1:64
	3°	1:8
	4°	1:4

Tanto la cepa BV como la cepa NT se replicaron en huevos embrionados incubados a 28°C, mostrando embriones de menor tamaño al control y con hemorragias cutáneas. Además, se constató actividad hemoaglutinante en los fluidos alantoideos correspondientes a cada cepa (Cuadro 5). Adicionalmente, la identidad de ambos virus, antes y después de su adaptación a huevo embrionado, pudo ser comprobada mediante la técnica de PCR (Capítulo 6). El bajo título obtenido en el huevo infectado con NT pudo deberse a un embrión defectuoso o a error humano al momento de realizar la infección.

Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Ahne et al., 1999a, quien describió títulos de $10^{7,8-8,2}$ TCID₅₀/ml del virus en la membrana corio-alantoidea y en el fluido amniótico de huevos infectados con una cepa de PMVO y mantenidos a 28°C. Como signo patológico se presentó hemorragias en la piel del embrión y en la membrana alantoidea. El

cerebro, hígado y piel fueron los órganos del embrión que presentaron los títulos más bajos del virus.

En concordancia con otros autores, los resultados obtenidos permiten resaltar la utilidad del sistema huevo embrionado en la replicación de PMVO (Ahne et al., 1999a), sistema que, además, es una opción barata y fácil de manipular para el estudio viral (Genway Biotech Inc., 1998). Al ser un sistema cerrado y no invasivo se pueden recuperar grandes cantidades de antígeno o anticuerpo de un solo huevo de forma rápida y hace innecesario el uso de animales de laboratorio (Genway Biotech Inc., 1998; Hodek & Stiborová, 2003).

Cuadro 5. Título de HA de fluido alantoideo de huevos embrionados según cepa.

Huevo	Cepa	Título HA
1	Bush Viper	1: 64
2	Bush Viper	1: 64
3	Neotropical	1: 16
4	Neotropical	1:2
5	Control Negativo	< 1:2
6	Control Negativo	< 1:2

3.4. Inmunización de aves

El análisis del suero de las aves mediante ELISA, realizado previo a la inmunización, reveló ausencia de anticuerpos a los agentes considerados por lo que se les puede considerar libres de ellos (Saif, 2003).

Utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, las aves inmunizadas mostraron títulos fuertes de anticuerpos contra ambas cepas a los 35 días posteriores a la primera inoculación (Cuadro 6). A los 35 días posteriores a la inmunización, el suero de las aves 2-NT y 3-NT presentaron los títulos más elevados de 1:1280. Con la cepa BV, el ave 1-

BV presentó los títulos más elevados de 1:640. Las aves control negativo no presentaron anticuerpos contra el PMVO en ninguna de las pruebas de IHA. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de las aves en la preparación de antisueros (Hodek & Stiborová, 2003).

Cuadro 6. Título de anticuerpos (IHA) en suero de aves antes y después de la inmunización con dos cepas de PMVO.

Identificación	Resultado IHA previo a inmunización	Resultados IHA 35 días posterior 1° inmunización (eutanasia)
1-BV	< 1:10	1:640
2-BV	< 1:10	1:320
3-BV	< 1:10	1:160
1-NT	< 1:10	1:320
2-NT	< 1:10	1:1280
3-NT	< 1:10	1:1280
C -	< 1:10	< 1:10
C-	< 1:10	< 1:10
C-	< 1:10	< 1:10

La inmunización de estas aves permitió darle validez a la prueba de IHA al contar con controles positivos y negativos con anticuerpos específicos cada vez que esta era realizada (Hodek & Stiborová, 2003; Lloyd et al., 2005). Los títulos finales obtenidos pueden corresponder con las inmunizaciones cortas realizadas, las cuales suelen ser más específicas con la desventaja que producen títulos más bajos de anticuerpos (Tijssen, 1985). La inoculación del antígeno de manera intravenosa puede ser utilizada en antígenos solubles o que sean muy particulares como en este caso (Tijssen, 1985). Además, las aves tienen una

mejor respuesta inmune que los mamíferos, produciendo mayor cantidad de anticuerpos con poco antígeno inoculado (Hodek & Stiborová, 2003). Otra ventaja de la inmunización es que raramente tiene efectos secundarios en las aves, como la inflamación y la presencia de abscesos (Hodek & Stiborová, 2003). La protección es fuerte y de larga duración ya que se produce la respuesta secundaria en el animal por inyecciones repetidas del antígeno (Tizard, 1995).

Se realizó la prueba de IHA en los sueros de las aves utilizando como antígeno el virus homólogo y heterólogo en cada caso (Cuadro 7). En el caso de la cepa BV, los resultados con ambas cepas se diferencian por una sola dilución por lo tanto son muy similares. En el caso de la cepa NT, los títulos son mayores al utilizar la cepa homóloga como antígeno.

Estos hallazgos demuestran la semejanza entre las dos cepas ya que producen una reacción cruzada al ser utilizadas en la prueba de IHA. Los resultados coinciden con Kindermann et al., 2001, el cual demuestra que las dos cepas tienen una semejanza de 94,0% entre las secuencias de aminoácidos de sus genes HN.

Cuadro 7. Título de anticuerpos (IHA) en suero de aves utilizando las cepas de PMVO homólogas y heterólogas como antígenos.

Identificación ave	Título BV	Título NT
1-BV	1:640	1:320
2-BV	1:320	1:640
3-BV	1:160	1:320
1-NT	1:40	1:320
2-NT	1:320	1:1280
3-NT	1:160	1:1280

3.5. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

Los resultados de la prueba de IHA para ambas cepas de PMVO se presentan a continuación de la siguiente forma: prevalencia por establecimiento y porcentaje por grado de positividad, prevalencia por especie de vipérido y porcentaje por grado de positividad y, desglose de los resultados positivos por cepa viral, establecimiento y especie.

3.5.1. Prevalencia por establecimiento y porcentaje por grado de positividad

La presente investigación demuestra por vez primera en Costa Rica la evidencia serológica de infecciones con dos cepas de PMVO en vipéridos mantenidos en cautiverio. Tal y como se observa en los cuadros 8 y 9, la prevalencia total en los serpentarios estudiados osciló entre un 46,2% y un 0,0% para ambas cepas. En lo que respecta a la cepa BV, los serpentarios ICP, SM y P1 poseen prevalencias de 46,2%, 37,3% y 25,0% respectivamente, en tanto que en los establecimientos ZSB, MS y P2 la prevalencia fue de 0,0%. Por otra parte, considerando la cepa NT, los serpentarios ICP, ZSB, SM y P1 poseen prevalencias de 46,2%, 27,3%, 27,3% y 25,0% respectivamente, mientras que los establecimientos MS y P2 poseen prevalencias de 0,0%.

De los mismos cuadros se desprende que el porcentaje de positivos leves para la cepa BV en el ICP, SM, y P1 fue de 20,0%, 18,2% y 12,5% respectivamente, mientras que los serpentarios RH, ZSB, MS, y P2 presentaron un 0%. Para la cepa NT, el porcentaje de positivos leves para los establecimientos ZSB, RCR, ICP y SM fue de 27,3%, 20,0%, 18,5% y 18,2% respectivamente, y el de los serpentarios RH, MS y P2 fue de 0,0%.

El RH y el ICP presentaron un porcentaje de positivos moderados de 20,0% y 15,4%, respectivamente con la cepa BV. En contraste, el resto de los serpentarios presentan un 0,0% de positivos moderados. Lo mismo se repite con la cepa NT, donde el RH y el ICP tienen un

porcentaje de positivos moderados de 20,0% y 6,2% respectivamente, mientras que los demás serpentarios tienen un 0,0%.

En relación al porcentaje de positivos fuertes, el P1, ICP y SM presentaron un 12,5%, 10,8% y 9,1% respectivamente para la cepa BV mientras que el ICP, P1 y SM presentaron un porcentaje del 21,5%, 12,5% y 9,1% para la cepa NT respectivamente. Los serpentarios RH, RCR, ZSB, MS y P2 presentaron un 0,0% en los resultados de los positivos fuertes para ambas cepas.

Un 74,0% de las 150 muestras analizadas resultó negativo en la prueba de IHA frente a la cepa BV mientras que un 71,4% resultó negativo a la cepa NT. Las colecciones MS y P2 resultaron negativas a la prueba en la totalidad de sus muestras. El ZSB resultó negativo a la cepa BV pero tuvo un 72,7% de negativos para la cepa NT. Un 53,8% de las muestras recolectadas en el ICP resultaron negativas a ambas cepas.

Cuadro 8. Prevalencia por serpentario, y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa BV.

Serpentario	Total de muestras	PT (%)	PL (%)	PM (%)	PF (%)	N (%)
ICP	65	30 (46,2)	13 (20,0)	10 (15,4)	7 (10,8)	35 (53,8)
RH	5	1 (20,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	4 (80,0)
RCR	10	1 (10,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (90,0)
ZSB	11	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (100,0)
SM	11	3 (37,3)	2 (18,2)	0 (0,0)	1 (9,1)	8 (72,7)
SG	13	2 (15,4)	1 (7,7)	0 (0,0)	1 (7,7)	11 (84,6)
P1	8	2 (25,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (12,5)	6 (75,0)
MS	16	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	16 (100,0)
P2	11	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (100,0)
Total	150	39 (26,0)	18 (12,0)	11 (7,3)	10 (6,7)	111 (74,0)

Cuadro 9. Prevalencia por serpentario, y frecuencias absolutas y relativas de las muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa NT.

Serpentario	Total de muestras	PT (%)	PL (%)	PM (%)	PF (%)	N (%)
ICP	65	30 (46,2)	12 (18,5)	4 (6,2)	14 (21,5)	35 (53,8)
RH	5	1 (20,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	4 (80,0)
RCR	10	2 (20,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (80,0)
ZSB	11	3 (27,3)	3 (27,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (72,7)
SM	11	3 (27,3)	2 (18,2)	0 (0,0)	1 (9,1)	8 (72,7)
SG	13	2 (15,4)	1 (7,7)	0 (0,0)	1 (7,7)	11 (84,6)
P1	8	2 (25,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (12,5)	6 (75,0)
MS	16	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	16 (100,0)
P2	11	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (100,0)
Total	150	43 (28,6)	21 (14,0)	5 (3,3)	17 (11,3)	1071,4)

3.5.2. Prevalencia por especie de vipérido y porcentaje de positividad por grado

La muestra analizada en este estudio se conformó por once especies de vipéridos. Considerando los PT, frente a las dos cepas de PMVO utilizadas, la especie *Crotalus simus* presentó la prevalencia más elevada (54,4%), seguido de *Crotalus adamanteus* con 40,0% y *Atropoides picadoi* con 28,6% (Cuadros 10 y 11).

La especie con mayor porcentaje de muestras positivas leves, frente a las cepas BV y NT, fue *Crotalus simus* con un 24,6% y 22,8%, respectivamente. La mayor diferencia en los resultados de esta especie se aprecia en las positivas moderadas donde presentó un 17,5% para la cepa BV, y un 7,0% para la cepa NT. Por otra parte, en el grupo de positivas fuertes presentó un 12,3% para la cepa BV y un 24,6% para la cepa NT según se desprende de los Cuadros 10 y 11.

La especie *Atropoides picadoi* presentó igual número de positivas leves y fuertes hacia ambas cepas con un 14,3% del total de sus muestras. Un 2,5% de las muestras de la especie *Bothrops asper* resultó positivo moderado frente a ambas cepas. La especie *Bothriechis schlegelii* presentó un 16,7% de sus muestras positivas leves y un 8,3% positivas fuertes hacia la cepa BV. Con la cepa NT, se presentó una diferencia en las positivas leves ya que presentó 25,0% de la totalidad de sus muestras.

Las especies que resultaron negativas para ambas cepas fueron *Atropoides mexicanus*, *Crotalus vegrandis*, *Cerrophidion godmani*, *Lachesis stenophrys*, y *Porthridium nasutum*. Las muestras de *Bothriechis lateralis* resultaron negativas para la cepa BV pero presentaron un 20,0% de positivas leves para NT.

Cuadro 10. Especie de vipérido y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa BV.

Especie de vipérido	Muestras	PT (%)	PL (%)	PM (%)	PF (%)	N (%)
<i>Atropoides mexicanus</i>	2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
<i>Atropoides picadoi</i>	7	2 (28,6)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (14,3)	5 (71,4)
<i>Bothrops asper</i>	40	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (2,5)	0 (0,0)	39 (97,5)
<i>Bothriechis lateralis</i>	15	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (100,0)
<i>Bothriechis schlegelii</i>	12	3 (25,0)	2 (16,7)	0 (0,0)	1 (8,3)	9 (75,0)
<i>Crotalus adamanteus</i>	5	2 (40,0)	1(20,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	3 (60,0)
<i>Crotalus vegrandis</i>	3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)
<i>Crotalus simus</i>	57	31 (54,4)	14 (24,6)	10 (17,5)	7 (12,3)	26 (45,6)
<i>Cerrophidion godmani</i>	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)
<i>Lachesis stenophrys</i>	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)
<i>Porthidium nasutum</i>	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
Total	150	39 (26,0)	18 (12,0)	11 (7,3)	10 (6,7)	111 (74,0)

Cuadro 11. Especie de vipérido y frecuencias absolutas y relativas de muestras positivas totales (PT), positivas leves (PL), positivas moderadas (PM), positivas fuertes (PF) y negativas (N) a la cepa NT.

Especie de vipérido	# Muestras	PT (%)	PL (%)	PM (%)	PF (%)	N (%)
<i>Atropoides mexicanus</i>	2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
<i>Atropoides picadoi</i>	7	2 (28,6)	1(14,3)	0 (0,0)	1 (14,3)	5 (71,4)
<i>Bothrops asper</i>	40	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (2,5)	0 (0,0)	39 (97,5)
<i>Bothriechis lateralis</i>	15	3 (20,0)	3 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (80,0)
<i>Bothriechis schlegelii</i>	12	4 (33,3)	3 (25,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	8 (66,7)
<i>Crotalus adamanteus</i>	5	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	3 (60,0)
<i>Crotalus vegrandis</i>	3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)
<i>Crotalus simus</i>	57	31 (54,4)	13 (22,8)	4 (7,0)	14 (24,6)	26 (45,6)
<i>Cerrophidion godmani</i>	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)
<i>Lachesis stenophrys</i>	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)
<i>Porthidium nasutum</i>	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
Total	150	43(28,6)	21 (14,0)	5 (3,3)	17 (11,4)	107 (71,3)

3.5.3. Desglose de los resultados positivos por cepa viral, establecimiento y especie

El 26,0% (n=39) de los 150 individuos analizados resultó positivo a la prueba de IHA utilizando la cepa BV, mientras que el 28,6% (n=43) resultó positivo a la prueba utilizando la cepa NT.

3.5.3.1. Positivos leves

Cepa Bush Viper

Un 12,0% (n=18) del total de 150 individuos resultó positivo leve a la prueba de IHA utilizando la cepa BV como antígeno (Cuadro 12). Las serpientes pertenecen a cinco colecciones diferentes distribuidas en tres provincias del país. El 72,2% (n=13) de los 18 individuos positivos leves pertenece al mismo serpentario (ICP) y el 83,3% (n=15) proviene de la provincia de San José.

Cuadro 12. Resultados positivos leves de la cepa BV por serpentario, número de identificación y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado BV
ICP	5	<i>Crotalus simus</i>	1:20
ICP	6	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	10	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	11	<i>Crotalus simus</i>	1:20
ICP	13	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	15	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	16	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	21	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	23	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	24	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	26	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	35	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	36	<i>Crotalus simus</i>	1:80
RCR	44	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:20
SM	67	<i>Atropoides picadoi</i>	1:80
SM	70	<i>Crotalus simus</i>	1:20
SG	112	<i>Crotalus adamanteus</i>	1:40
PI	117	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:40

En lo que respecta al género, 83,3% (n=15) de los 18 animales positivos leves pertenece al género *Crotalus*, 11,1% (n=2) al género *Bothriechis*, y 5,6% (n=1) al género *Atropoides*. Un 22,2% (n=4) de las 18 serpientes resultó con títulos de 1:20, un 27,8% (n=5) con títulos de 1:40, y un 50,0% (n=9) con títulos de 1:80.

Cepa Neotropical

Un 14,0% (n=21) del total de 150 individuos resultó positivo leve a la prueba de IHA utilizando la cepa NT como antígeno (Cuadro 13).

Cuadro 13. Resultados positivos leves para la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado NT
ICP	5	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	6	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	11	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	13	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	16	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	21	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	23	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	26	<i>Crotalus simus</i>	1:40
ICP	28	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	29	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	35	<i>Crotalus simus</i>	1:80
ICP	36	<i>Crotalus simus</i>	1:40
RCR	44	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:20
RCR	47	<i>Bothriechis lateralis</i>	1:20
ZSB	57	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:20
ZSB	59	<i>Bothriechis lateralis</i>	1:20
ZSB	60	<i>Bothriechis lateralis</i>	1:20
SM	67	<i>Atropoides picadoi</i>	1:80
SM	70	<i>Crotalus simus</i>	1:20
SG	112	<i>Crotalus adamanteus</i>	1:20
PI	117	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:40

Las serpientes pertenecen a seis colecciones diferentes distribuidas en tres provincias del país. El 57,1% (n=12) de los 21 individuos positivos leves pertenece al mismo serpentario (ICP) y el 90,5% (n=19) proviene de la provincia de San José. En lo que respecta al género, 66,7% (n=14) de los 21 animales positivos leves pertenece al género *Crotalus*, 28,6% (n=6) al género *Bothriechis*, y 4,7% (n=1) al género *Atropoides*. Un 33,3% (n=7) de las 21 serpientes resultó con títulos de 1:20, un 23,8% (n=5) con títulos de 1:40, y un 42,9% (n=9) con títulos de 1:80.

El 10,0% (n=15) de los 150 individuos resultó positivo leve hacia ambas cepas (Cuadro 14). El 53,3% (n=8) de los 15 individuos resultó con el mismo nivel de anticuerpos en ambas cepas, el 40,0% (n=6) se diferencia por una dilución en base dos, mientras que el 6,6% (n=1) se diferencia por dos diluciones.

Cuadro 14. Comparación de resultados positivos leves a ambas cepas.

ID	Resultados	
	BV	NT
5	1:20	1:40
6	1:80	1:80
11	1:20	1:80
13	1:80	1:80
16	1:80	1:80
21	1:80	1:80
23	1:80	1:40
26	1:80	1:40
35	1:40	1:80
36	1:80	1:40
44	1:20	1:20
67	1:80	1:80
70	1:20	1:20
112	1:40	1:20
117	1:40	1:40

3.5.3.2. Positivo moderado

Cepa Bush Viper

Un 7,3% (n=11) del total de 150 individuos resultó positivo moderado a la prueba de IHA utilizando la cepa BV como antígeno (Cuadro 15). Las serpientes pertenecen a dos colecciones diferentes ubicadas en la provincia de San José. El 91,0% (n=10) de los 11 individuos positivos moderados pertenece al mismo serpentario (ICP). En lo que respecta al género, 91,0% (n=10) de los 11 animales positivos moderados pertenece al género *Crotalus*, y 9,0% (n=1) pertenece al género *Bothrops*.

Cuadro 15. Resultados positivos intermedios para la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado BV
ICP	17	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	18	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	19	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	20	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	28	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	29	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	30	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	31	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	38	<i>Crotalus simus</i>	1:160
RH	42	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	77	<i>Bothrops asper</i>	1:160

Cepa Neotropical

Un 3,3% (n=5) del total de 150 individuos resultó positivo moderado a la prueba de IHA utilizando la cepa NT como antígeno (Cuadro 16). Las serpientes pertenecen a dos colecciones diferentes ubicadas en la provincia de San José. El 80,0% (n=4) de los 5 individuos positivos moderados pertenece al mismo serpentario (ICP) y el mismo porcentaje pertenece al género *Crotalus*. Un 20,0% (n=1) pertenece al género *Bothrops*.

Cuadro 16. Resultados positivos intermedio a la cepa NT por serpentario, número de identificación, y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado NT
ICP	10	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	17	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	24	<i>Crotalus simus</i>	1:160
RH	42	<i>Crotalus simus</i>	1:160
ICP	77	<i>Bothrops asper</i>	1:160

El 2,0% (n=3) de los 150 individuos resultaron positivos leves hacia ambas cepas (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comparación entre los positivos moderados de ambas cepas.

ID	Resultados BV y NT
17	1:160
42	1:160
77	1:160

3.5.3.3. Positivos fuertes

Cepa Bush Viper

Un 6,7% (n=10) del total de 150 individuos resultó positivo fuerte a la prueba de IHA utilizando la cepa BV como antígeno (Cuadro 18). Las serpientes pertenecen a cuatro colecciones diferentes distribuidas en tres provincias del país. El 70,0% (n=7) de los 10 individuos positivos fuertes pertenece al mismo serpentario (ICP) y el 80,0% (n=8) proviene de la provincia de San José. En lo que respecta al género, 80,0% (n=8) de los 10 animales positivos fuertes pertenece al género *Crotalus*, 10,0% (n=1) al género *Bothriechis*, y 10,0% (n=1) al género *Atropoides*. Un 60,0% (n=6) de las 10 serpientes resultó con títulos de 1:320, un 10,0% (n=1) con títulos de 1:640, un 20,0% (n=2) con títulos de 1:2560 y 10,0% (n=1) con títulos de 1:20480. El resultado de esta última muestra (ID #14) indica que pudo haber sobrevivido una infección con el PMVO (Jacobson & Origgi, 2007).

Cuadro 18. Resultados positivos fuertes a la cepa BV por serpentario, número de identificación, y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado BV
ICP	12	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	14	<i>Crotalus simus</i>	1:20480
ICP	22	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	25	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	33	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	34	<i>Crotalus simus</i>	1:640
ICP	37	<i>Crotalus simus</i>	1:320
SM	68	<i>Atropoides picadoi</i>	1:2560
SG	111	<i>Cotalus adamanteus</i>	1:320
PI	114	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:2560

Cepa Neotropical

Un 11,4% (n=17) del total de 150 individuos resultó positivo fuerte a la prueba de IHA utilizando la cepa NT como antígeno (Cuadro 19). Las serpientes pertenecen a cuatro colecciones diferentes distribuidas en tres provincias del país. El 82,4% (n=14) de los 17 individuos positivos fuertes pertenece al mismo serpentario (ICP) y el 88,2% (n=15) proviene de la provincia de San José y pertenece al género *Crotalus*. Un 5,9% (n=1) pertenece al género *Bothriechis* y 5,9% (n=1) al género *Atropoides*. Un 47,0% (n=8) de las 17 serpientes resultó con títulos de 1:320, un 23,5% (n=4) con títulos de 1:640, un 11,7% (n=2) con títulos de 1:1280, un 5,8% (n=1) con títulos de 1:2560, 1:10240, y 1:20480. La serpiente número 14 es la que presenta los títulos más altos con esta cepa de 1:20480.

El 6,6% (n=10) de los 150 individuos resultaron positivos fuertes hacia ambas cepas (Cuadro 20). El 50% (n=5) de los 10 individuos resultaron con el mismo nivel de anticuerpos en ambas cepas, el 30,0% (n=3) se diferencian solo por un título, mientras que el 20,0% (n=2) se diferencia por dos o más títulos.

Cuadro 19. Resultados positivos fuertes a la cepa NT por serpentario, número de identificación, y especie.

Serpentario	ID	Especie	Resultado NT
ICP	12	<i>Crotalus simus</i>	1:640
ICP	14	<i>Crotalus simus</i>	1:20480
ICP	15	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	18	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	19	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	20	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	22	<i>Crotalus simus</i>	1:640
ICP	25	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	30	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	31	<i>Crotalus simus</i>	1:640
ICP	33	<i>Crotalus simus</i>	1:640
ICP	34	<i>Crotalus simus</i>	1:10240
ICP	37	<i>Crotalus simus</i>	1:320
ICP	38	<i>Crotalus simus</i>	1:640
SM	68	<i>Atropoides picadoi</i>	1:2560
SG	111	<i>Cotalus adamanteus</i>	1:1280
P1	114	<i>Bothriechis schlegelii</i>	1:1280

Cuadro 20. Comparación de títulos positivos fuertes con las dos cepas.

ID	Resultados BV	Resultados NT
12	1:320	1:640
14	1:20480	1:20480
22	1:320	1:640
25	1:320	1:320
33	1:320	1:320
34	1:640	1:10240
37	1:320	1:320
68	1:2560	1:2560
111	1:320	1:1280
114	1:2560	1:1280

La IHA es utilizada como prueba rápida y sencilla para diagnosticar casos positivos de exposición o infección con PMVO (Jacobson & Origgi, 2007); sin embargo, en la literatura consultada, no se encontraron reportes de estudios de seroprevalencia del PMVO utilizando

las cepas BV y NT como antígeno. La sensibilidad y especificidad de la prueba no han sido determinadas ya que no hay información suficiente proveniente de animales experimentales que hayan sobrevivido a la infección para calcular dichos parámetros (Jacobson, 2009). Tampoco se ha llegado a un consenso internacional para la línea de corte de la prueba para diferenciar a los animales positivos de los negativos (Allender et al., 2008). Algunos autores consideran los títulos $> 1:160$ como positivos (Jacobson & Origgi, 2007) en tanto que otros sitúan la positividad a partir de $1:20$ (Jacobson et al., 1991; Allender et al., 2006; Knotek et al., 2007; Pees et al., 2010). Este último criterio fue el que predominó en la presente investigación, debido además, a la experiencia previa con el PMV-1 aviar, que considera como positivos los títulos $> 1:8$ o $1:16$ (OIE, 1996).

Una desventaja de la IHA es su dificultad para distinguir reacciones cruzadas entre cepas del PMVO antigénicamente similares (Lloyd et al., 2005; Allender et al., 2006; Allender et al., 2008). Un estudio realizado para analizar las relaciones entre los PMV aviares y de reptiles demostró que los PMVO presentan una reacción cruzada con los PMV aviares tipo 1 y 7 comprobando así la relación evolutiva entre los virus (Blahak, 1995). En nuestro caso se utilizó como antígenos de PMVO las dos únicas cepas de referencia disponibles en el ATCC®, de las cuales se desconoce su relación antigénica, en particular lo referente a la proteína HN. En general los resultados positivos obtenidos frente a ambas cepas son muy similares, lo que podría interpretarse como que ambas cepas están relacionadas antigénicamente (Kindermann et al., 2001).

Varios factores influyen en los resultados de prueba de IHA y podrían llevar a falso negativo. Algunos de estos son la afinidad del anticuerpo por el antígeno (exposición anterior al antígeno utilizado), el método de cultivo del antígeno, la presencia y calidad del anticuerpo,

el manejo de las muestras, y la respuesta inmune del animal (Lloyd, et al., 2005; Allender et al., 2008).

Tras una infección, las serpientes pueden tardar hasta diez semanas en montar una respuesta inmunológica, por lo tanto, en situaciones de estudio de brotes, un título bajo de anticuerpos hacia el PMVO en la prueba de IHA no refleja un resultado negativo definitivo a la infección (Lloyd et al., 2005; Pees et al., 2010). La respuesta inmune del animal también es influenciada por el ambiente y las condiciones en las que es mantenido (Lloyd et al., 2005). Es por estas razones que, en caso de un brote, la prueba de IHA se debe realizar con sueros pareados ya que un aumento significativo en los títulos del animal al segundo muestreo demuestra una infección activa, una exposición repetida al antígeno, o podría clasificar al animal como persistentemente infectado (Jacobson et al., 1992; Lloyd et al. 2005).

Además de los sueros pareados se deben realizar exámenes complementarios a la IHA para un diagnóstico definitivo de exposición al PMVO (Jacobson et al., 1991; Allender et al., 2008; Pees et al., 2010) como por ejemplo ELISA (Kania et al., 2000), inmunoperoxidasa (Homer et al., 1995), inmunofluorescencia (Mayr et al., 2000), PCR con secuenciación de productos (Ahne et al., 1999b; Sand et al., 2004), aislamiento del virus en cultivo celular (Mayr et al., 2000), hallazgos histopatológicos, y microscopía electrónica (Kolesnikovas et al., 2006).

Idealmente, la prueba de inmunohistoquímica se debe realizar con muestras de cerebro, pulmón, hígado, y riñón siendo estos los órganos con mayor tropismo al virus (Sand et al., 2004).

Al estudiar una población se deben tomar en cuenta diferentes factores como la historia clínica de los individuos, el manejo del serpentario y de los animales, las medidas de

cuarentena en los centros, entre otros (Allender et al., 2008). El origen del animal también es importante ya que éste puede provenir de una colección que ya ha sido expuesta al virus representando un riesgo para la colección a la que va a ser introducido (Pees et al., 2010).

Un periodo de cuarentena de 90 días es esencial en animales nuevos en una colección para evitar la infección no solo de virus sino de otros agentes infecciosos como bacterias, hongos y parásitos que pueden presentar una amenaza para los demás animales (Pees et al., 2010). Se debe realizar una prueba de IHA al comienzo y otra al final de la cuarentena antes de ser introducido y de ser posible complementar con una prueba de PCR (Jacobson et al., 1991; Lloyd et al., 2005; Pees et al. 2010).

En un estudio de prevalencia realizado en Alemania (Pees et al., 2010), cien boas aparentemente sanas, de catorce colecciones diferentes, fueron muestreadas para realizar las pruebas de IHA y PCR utilizando hisopados traqueales y cloacales para diagnosticar el PMVO. En la prueba de IHA se encontró un caso positivo fuerte (1:128) en la población muestreada, y tres casos con títulos menores a 1:20. Sin embargo, para la prueba de PCR, se evidenció que nueve individuos estaban infectados. Esto demuestra la importancia de exámenes complementarios a la IHA con mayor sensibilidad para evidenciar casos de infección por PMVO (Pees et al., 2010).

La presente investigación se centró en muestrear serpientes en cautiverio pertenecientes a la familia *Viperidae* pero el PMVO ha sido descrito en las demás familias del suborden *Ophidia* (Sand et al., 2004; Bronson, 2006; Jacobson, 2007). También el PMVO ha sido reportado en cascabeles en vida libre en los Estados Unidos donde la prevalencia fue 100% al realizar la prueba de IHA (Allender et al., 2006). Diferentes cepas de PMV han sido aisladas de miembros del suborden *Sauria* (lagartijas e iguanas) y *Testudines* (tortugas)

demostrando así la facilidad con que los PMV se han adaptado a diferentes especies de reptiles (Lloyd et al., 2005; Marschang et al., 2008). Por lo tanto, en Costa Rica son necesarios más estudios serológicos, tanto en cautiverio como en vida libre, para conocer la situación de estas especies frente a estos virus.

Diversas investigaciones han identificado más de dieciocho cepas diferentes de PMVO clasificadas molecularmente en los grupos A y B pero todavía son necesarios más estudios para determinar su similitud genética y su reacción en las pruebas de IHA (Ahne et al., 1999b; Franke et al., 2001; Allender et al., 2008; Papp et al., 2010). Todavía no es posible hablar de serotipos para los PMVO, por lo tanto las cepas pueden ser diferenciadas al secuenciarse hasta que su género en la familia *Paramyxoviridae* y sus especies de virus sean determinados (Papp et al. 2010).

A diferencia del PMV-1 aviar, se desconoce si el PMVO posee diferentes grados de patogenicidad y por lo tanto se ignora la forma como puede afectar diferentes poblaciones de reptiles (Lloyd et al., 2005).

En este estudio se encontró una relación entre el año en que las serpientes habían ingresado a la colección del ICP y el resultado a la prueba. De las 65 serpientes muestreadas, 54 ingresaron entre los años 1994-2006 y todas presentan títulos de positivo leves a positivos fuertes, mientras que solo una serpiente que ingresó en el año 2009 presentó un resultado positivo moderado. Las serpientes muestreadas que habían ingresado entre el año 2008 y 2009 resultaron negativas. La persistencia del virus en los animales infectados todavía no ha sido confirmada (Pees et al., 2010) pero se necesita realizar más estudios con esta colección para determinar la posible fuente de infección de los animales que ingresan al centro.

En un animal que responde a una infección por el PMVO, los anticuerpos comienzan a declinar de tres a siete meses después de la exposición, encontrándose susceptibles a nuevas reinfecciones (Jacobson et al. 1992). Es por esta razón que las vacunas inactivadas del PMVO estudiadas hasta el momento no han resultado efectivas como protección contra el virus (Jacobson et al. 1992).

3.6. Extracción de ARN, conversión a cDNA, prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

La técnica de PCR permite el diagnóstico ante mortem rápido y específico del PMVO utilizando muestras clínicas como lavados transtraqueales, fluido de la cavidad oral, secreciones bronquiales, hisopados cloacales, y biopsias. También permite el diagnóstico post-mortem del virus utilizando muestras frescas de órganos, tejidos en formalina, y cultivos celulares infectados. Además permitiría identificar a animales persistentemente infectados en una colección y que excretan bajos niveles del virus (Sand et al., 2004).

El pulmón es la muestra más confiable para realizar el PCR aunque también ha sido útil complementar con muestras de intestino y riñón (Papp et al., 2010). También se podría aislar el PMVO de la orina, saliva y glándulas del veneno (Junqueira de Azevedo et al., 2001).

Utilizando los primers establecidos por Sand y colaboradores se obtiene un producto de bajo peso molecular (153pb) (Sand et al. 2004). Esto es útil en el diagnóstico post-mortem del PMVO ya que la presencia de ARNasas en el tejido pueden hacer que el ARN presente se haya degradado a productos más pequeños que no serían detectados con secuencias mayores (Sand et al. 2004).

Todas las muestras fueron procesadas con el protocolo de PCR descrito por Sand y colaboradores (2004). Los productos de 153pb fueron observados en el transiluminador de luz UV en las seis muestras comprobando la presencia del virus durante los diferentes pasajes del virus (Figuras 1 y 2).

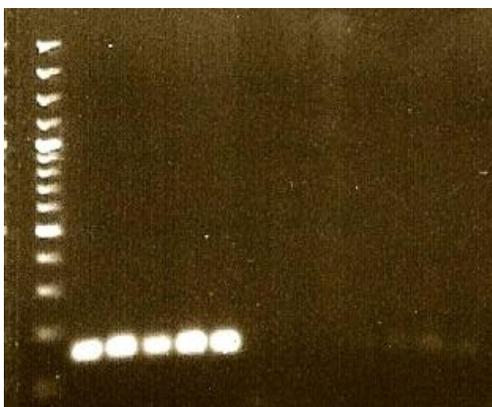


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la cepa BV mostrando cinco bandas de 153pb: primera banda virus original, segunda banda pasaje en huevo embrionado, tercera banda duplicado del pasaje en huevo embrionado, cuarta banda cultivo celular tercer pasaje, y quinta banda duplicado del cultivo celular tercer pasaje.

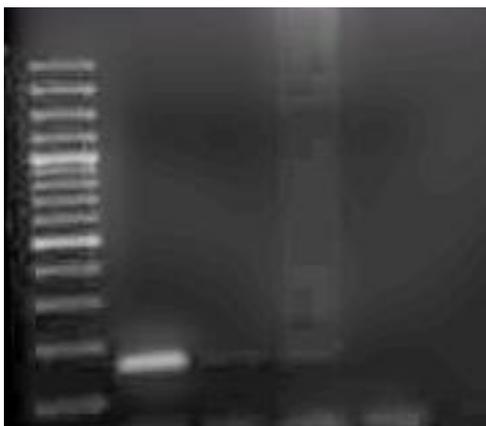


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de la cepa NT mostrando tres bandas de 153pb: primera banda virus original, segunda banda pasaje en huevo embrionado, y tercera banda cultivo celular 3P. El último espacio corresponde al control negativo.

Esta técnica diagnóstica fue utilizada en el estudio de un caso clínico remitido por el Dr. Randall Arguedas al Laboratorio de Patología y al Laboratorio de Virología de la Escuela

de Medicina Veterinaria. La serpiente era una *Bothriechis schlegelii* la cual presentaba una sintomatología nerviosa con ataxia y posicionamiento anormal de su cabeza. Provenía de una colección privada en Tres Ríos donde los síntomas se repetían en varios animales de la colección por lo tanto se sospechó de un agente infeccioso. Fue numerada con el consecutivo #114 para el estudio y la eutanasia y necropsia, así como el estudio histopatológico, se realizaron en el Laboratorio de Patología.

En los cortes histológicos se observaron inclusiones intranucleares características de Adenovirus en hígado (Figura 3), páncreas, y estómago, y se encontró *Salmonella* spp. en el cultivo del hígado realizado en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria. No se encontraron lesiones en cerebro y pulmón.

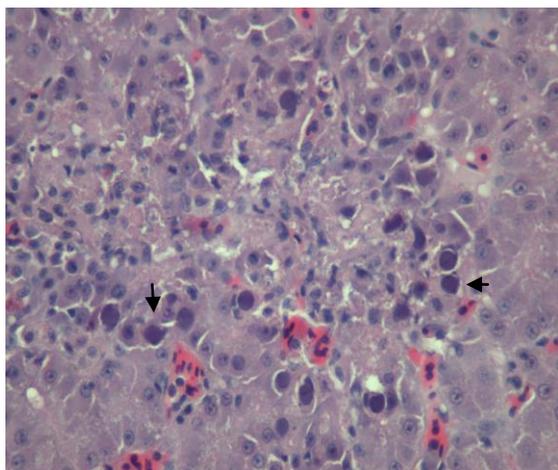


Figura 3. Inclusiones características de Adenovirus en hígado de *Bothriechis schlegelii*

El suero de esta serpiente resultó positivo fuerte en la prueba de IHA hacia ambas cepas de PMVO con títulos de 1:2560 con la cepa BV y 1:1280 con la cepa NT. Para realizar el PCR se extrajo ARN de las muestras de pulmón y cerebro siguiendo el protocolo de Villegas, 2000, el cual utiliza SDS, Proteinasa K y Trizol (Villegas, 2000).

La figura 4 muestra la electroforesis del caso donde se observa la banda de 153pb en el primer y tercer pozo los cuales contienen los productos del PCR realizado a los órganos. Este resultado representa el primer diagnóstico de PMVO en el país proveniente de un caso clínico.

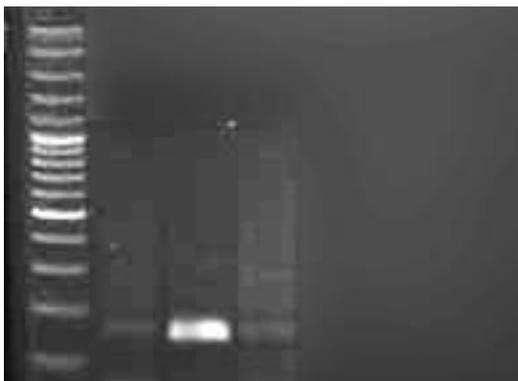


Figura 4: Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa, muestra #114: la primera banda corresponde al producto obtenido utilizando 2ul de cDNA, la segunda banda corresponde al control positivo utilizando el cDNA del virus original BV, y la tercera banda corresponde al producto obtenido empleando 5ul de cDNA

Una técnica de PCR más específica también ha sido descrita (Ahne et al., 1999b) con productos de 518pb para el gen L y de 352pb para el gen HN. El gen L ha resultado más conservado dentro de las cepas de PMVO ya que codifica para una polimerasa interna y no para una glicoproteína externa como el gen HN (Marschang, 2009; Papp et al., 2010). Se debe considerar su uso para diagnosticar las cepas de PMVO presentes en el país (Papp et al., 2010). Utilizando esta técnica de PCR se ha podido demostrar la presencia de cepas de PMV en lagartijas y tortugas que son molecularmente semejantes a las cepas encontradas en serpientes. A pesar de que no se ha encontrado el PMV en cocodrilos, algunos autores consideran que en realidad se debería hablar de PMV de reptiles y no PMVO (Marschang, 2009).

4. CONCLUSIONES

- Los datos de prevalencia totales, utilizando la prueba de IHA, demuestran que un 26,0% (n=39) de los 150 vipéridos muestreados presentan anticuerpos contra la cepa BV de PMVO, mientras que un 28,6% (n=43) de los animales presentan anticuerpos contra la cepa NT.
- La prueba de inhibición de la hemoaglutinación implementada permite detectar y cuantificar los anticuerpos circulantes contra el PMVO en serpientes.
- Los resultados de la prueba de IHA utilizando las dos cepas de PMVO, BV y NT, de muestran que éstas están antigénicamente relacionadas.
- Las células Vero y los huevos embrionados de pollo, incubados a 28°C, constituyen sistemas adecuados para la replicación, estudio y producción de antígenos de PMVO.
- La inmunización de aves con PMVO constituye un sistema útil y económicamente factible para la preparación de antisueros.
- La técnica de PCR permite la detección específica de genoma viral de PMVO en muestras de tejidos o fluidos.

5. RECOMENDACIONES

- Se encontró exposición al PMVO en siete de los nueve establecimientos muestreados por lo tanto se deben de tomar precauciones en los serpentarios para evitar la exposición de los animales a este virus, debiéndose llevar un registro de la colección con la historia clínica de cada animal, control y cuarentena adecuada de los animales nuevos que ingresan, detección de animales persistentemente infectados y la puesta en práctica de otras medidas de bioseguridad como la higiene y desinfección de las instalaciones con detergentes, solventes orgánicos y desinfectantes.
- Las condiciones de higiene y de manejo deben ser óptimas para evitar situaciones de inmunosupresión en los animales lo cual puede predisponer a la entrada del virus y de las infecciones concomitantes.
- Se debe ampliar el estudio a más familias de serpientes en cautiverio. Además se debe realizar un estudio de prevalencia del virus en poblaciones en vida silvestre.
- Por medio de la técnica de PCR y la secuenciación de sus productos se pueden identificar diferentes cepas del PMVO presentes en el país.
- Un resultado negativo a la prueba de IHA es posible en animales que no han montado una respuesta inmune al momento de la toma de la muestra, por lo tanto es necesario obtener una buena historia clínica del paciente, repetir la prueba en sueros pareados, o complementar el diagnóstico con pruebas moleculares como PCR.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., S. Hernández & S. Hernández. 2005. Atlas de medicina, terapéutica y patología de animales exóticos. Intermédica, Argentina.
- Ahne, W., J. Adrian & A. Mayr. 1999a. Replication of Reptilian Paramyxovirus in Avian Host Systems. *J. Vet. Med. B* 46: 57-62.
- Ahne, W., W.N. Batts, G. Kurath, & J.R. Winton. 1999b. Comparative sequence analyses of sixteen reptilian paramyxoviruses. *Vir. Res.* 63: 65-74.
- Allan W., J. Lancaster & B. Tóth. 1980. Vacunas contra la enfermedad de Newcastle. FAO, Italia.
- Allender, M., M. Mitchell., C. Phillips., K. Gruszynski. & V. Beasley. 2006. Hematology, plasma biochemistry, and antibodies to select viruses in wild-caught Eastern Massasauga Rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) from Illinois. *J. Wild. Dis.* 42(1): 107-114.
- Allender, M., M. Mitchell., M. Dreslik., C. Phillips., & V. Beasley. 2008. Measuring agreement and discord against different ophidian paramyxovirus strains in the Eastern Massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). *J. Zoo Wild. Med.* 39(3): 358-361.
- Arguedas, R. 2009. Entrevista con el Dr. Randall Arguedas. Encargado del Zoológico Simón Bolívar. San José, C.R. Jun 2.
- American Type Culture Collection (ATCC®). 2010. Product information sheet for VR-1408 & VR-1409. EEUU.
- Blahak, 1995. Isolation and characterization of Paramixoviruses and their relationship to Avian Paramyxoviruses. *J. Vet. Med. B* 42: 216-224.

- Bronson, E. 2006. Paramyxovirus. p. 858-861. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. 2nd. ed. Saunders, EEUU.
- Campbell, T. 2006. Clinical pathology of reptiles. p. 460-461. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. 2nd. ed. Saunders, EEUU.
- Campbell, T. & C. Ellis. 2007. Avian and Exotic Animal Cytology and Hematology. 3rd. ed. Blackwell, EEUU.
- Carlander, D., J. Stalber, & A. Larsson. 1999. Chicken antibodies: A clinical chemistry perspective. *Uppsala J Med Sci* 104:179-190.
- Childress, A. 2010. Comunicación personal [en línea]. Mensaje para: A. Childress. jul. 13. (Consulta: 13. jul. 2010).
- Clark H.F., F.S. Lief, P.D. Lunger, D. Waters, P. Leloup, D.W. Foelsch & R.W. Wyler. 1979. Fer de Lance Virus: a Probable Paramyxovirus isolated from a Reptile. *J. Gen. Virol.* 44: 405-418.
- Coborn, J. 1987. Snakes and lizards: Their Care and Breeding in Captivity. Ralph Curtis-Books-Publishing, Inglaterra.
- Cranfield, M. & T. Graczyk. 1996. Ophidian Paramyxovirus. p. 392-394. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. Saunders, EEUU.
- Denardo, D. 2006. Anatomy, Physiology, and Behavior. p. 42. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. 2nd. ed. Saunders, EEUU.
- Essbauer S. & W. Ahne. 2001. Viruses of lower vertebrates. *J. Vet. Med. B* 48: 403-475.
- Francisco, L., K. Fernandes & M. Mas. 2001. Class Reptilia, Order Squamata (Ophidia): Snakes. p. 40-49. *In* M. Fowler (ed). & Z, Cubas. (ed). *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State, EEUU.

- Franke, J., S. Essbauer, W. Ahne & S. Blahak. 2001. Identification and molecular characterization of 18 paramyxovirus isolated from snakes. *Virus Res.* 80: 67-74.
- Genway Biotech, Inc. Chicken antibodies. <https://www.genwaybio.com> (Consulta: 5 Ene. 2011)
- Heard, D., K. Harr, & J. Wellehan. 2004. Diagnostic sampling and laboratory tests. p. 45-48 *In* S. Girling, P, Raiti. *BSAVA Manual of Reptiles*. 2nd ed. British Small Animal Veterinary Association, Inglaterra.
- Herrero, U. L. & L. Hun. 1995. *Manual de virología clínica*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Hodek, P. & M. Stiborová. 2003. Chicken antibodies- Superior Alternative for Conventional Immunoglobulins. *Proc. Indian natn Sci Acad.* B69:461-468.
- Homer, B.L., J.P. Sundberg, J.M. Gaskin, J. Schumacher & E.R. Jacobson. 1995. Immunoperoxidase detection of ophidian paramyxovirus in snake lung using a polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:72-77.
- Jacobson, E.R. 2002. Reptilian Viral Diagnostics. p. 229-234. *In* A.M. Fudge, *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. WB Saunders, EEUU.
- Jacobson, E.R. 2007. Viruses and viral diseases of reptiles. p. 407-409. *In* E. Jacobson, *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles, Color atlas and text*. CRC, EEUU.
- Jacobson, E.R. 2009. Comunicación personal [en línea]. Mensaje para: E. Jacobson. oct. 6 (Consulta: 6 oct. 2009).
- Jacobson, E.R., J.M. Gaskin, C.F. Simpson & T.G. Terrel. 1980. Paramyxo-like virus infection in a rock rattlesnake. *JAVMA* 177:796-799.

- Jacobson, E.R., J.M. Gaskin, D. Page, W. Iverson & J. Johnson. 1981. Illness Associated with Paramyxo-like Virus Infection in a Zoologic Collection of Snakes. *JAVMA*. 179:1227-1230.
- Jacobson, E.R., J.M. Gaskin, J.P. Flanagan & R.A. Odum. 1991. Antibody responses of western diamondback rattlesnakes (*Crotalus atrox*) to inactivated ophidian paramyxovirus vaccines. *J. Zoo Wildl. Med.* 22: 184-190.
- Jacobson, E.R., J. Gaskin, S. Wells, K. Bowler & J. Shumacher. 1992. Epizootic of ophidian paramyxovirus in a zoological collection: pathological, microbiological, and serological findings. *J. Zoo Wildl. Med.* 23: 318-327.
- Jacobson, E.R., H.P. Adams, T.W. Geisbert, S.J. Tucker, B.J. Hall & B.L. Homer. 1997. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island Rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Vet. Pathol.* 34:450-459.
- Jacobson, E.R. & F. Origgi. 2007. Serodiagnostics. p. 381-392. *In* E. Jacobson. *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles, Color atlas and text*. CRC, EEUU.
- Junqueira de Azevedo I., Á. Prieto da Silva., E. Carmona. & P. Lee Ho. 2001. Characterization of a Paramyxovirus from a Fer de Lance viper (*Bothrops jararaca*): partial nucleotide sequence of the putative fusion protein. *Arch. Virol.* 146: 51-57.
- Kania, S., M. Kennedy., N. Nowlin., V. Diderrich., & E. Ramsey. 2000. Enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of ophidian paramyxovirus. *Proceedings of the EAZMV Meeting, Paris, 31. 5-4. 6. 2000, 71-73.*
- Kindermann, J., A. Kuber-Heiss., P. Kerschbaumer. & N. Nowotny. 2001 Phylogenetic analysis of the L and HN gene of ophidian paramyxoviruses. *Arch. Virology.* 146: 1021-1035.

- Kolesnikovas, C.K.M., K.F., Grego., L.C. Rameh de Albuquerque., E.R. Jacobson., T.A. Monezi., D.U. Mehnert., J.L. Catao-Dias. 2006. Ophidian paramyxovirus in Brazilian vipers (*Bothrops alternatus*). *Vet. Rec.* 159: 390-392.
- Knotech, Z., V. Jekl., G.M. Dorrestein., S. Blahak., & Z. Knotkova. 2007. Presumptive viral infections in captive populations of *Boa constrictor* in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina.* 52 (11): 512-520.
- Kurath, G., W. Batts., W. Anhe., & J. Winton. 2004. Complete genome sequence of Fer de Lance Virus reveals a novel gene in reptilian Paramyxoviruses. *J. of Vir.* 78: 2045- 2056
- Quesada, R. 2005. Hallazgos anatomo-histopatológicos en serpientes en cautiverio en Costa Rica. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Lloyd, M., R. Manvell, S. Drury & A.W. Sainsbury. 2005. Seroprevalence and significance of paramyxovirus titres in a zoological collection of lizards. *Vet. Rec.* 156: 578-580.
- Mader, D. 2006. Understanding the Human-reptile Relationship. p. 14-23. *In* D. Mader. *Reptile Medicine and Surgery.* 2nd. ed. Saunders, EEUU.
- Marschang, R. & J. Chitty. 2004. Infectious diseases. p. 332. *In* S. Girling & P. Raiti. *BSAVA Manual of Reptiles.* 2nd. ed. British Small Animal Veterinary Association, EEUU.
- Marschang, R., T. Papp & J. Frost. 2009. Comparison of paramyxovirus of snakes, lizards, and a tortoise. *Vir Res.*
- Mattison, C. 1992. *Keeping and Breeding Snakes.* Alden Press, Inglaterra.
- Mayr, A., J. Franke & W. Ahne. 2000. Adaptation of Reptilian Paramyxovirus to Mammalian Cells (Vero Cells). *J. Vet. Med.* B,47: 95-98.
- Meneses, A. 1993. *Manual de hematología y química clínica en medicina veterinaria.* Fundación UNA, Costa Rica.

- Mohanty, S. & S. Dutta. 1981. Veterinary virology. Lea & Febiger, EEUU.
- Morales, J.A. 2008. Entrevista con el Dr. Juan Alberto Morales. Coordinador del Laboratorio de Patología, Escuela de Veterinaria, Universidad Nacional. Heredia, C.R. Nov 5
- Mitchell, M. 2003. Ophidia (Snakes). p. 45 *In* M. Fowler & R. Miller. Zoo and Wild Animal Medicine. 5th. ed. Saunders, EEUU.
- Murphy, F., P. Gibbs, M. Horzinek, & M. Studdert. 1999. Veterinary Virology. 3ra ed. Academic Press, EEUU.
- OIE (World organization for animal health). 1996. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 3rd. ed. EEUU.
- Orós, J., J. Sicilia, A. Torrent, P. Castro, S. Déniz, A. Arencibia, E.R. Jacobson & B.L. Homer. 2001. Immunohistochemical detection of ophidian paramyxovirus in snakes in the Canary Islands. *Vet. Rec.* 149:21-23.
- Papp, T., M. Pees., V. Schmidt. & R. Marschang. 2010. RT-PCR diagnosis followed by sequence characterization of paramyxoviruses in clinical samples from snakes reveals concurrent infections within populations and/or individuals. *Vet. Microb.* 144:466-472.
- Pees, M., V. Schmidt., R. Marschang., K. Heckers., & M. Krautwald-Junghanns. 2010. Prevalence of viral infections in captive collections of boid snakes in Germany. *Vet. Rec.* 166: 422-425.
- Redrobe, S. & J. MacDonald. 1999. Sample collection and clinical pathology of reptiles. *The Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* 2: 709-730.
- Ritchie, B. 2006. Virology. p. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. 2nd. ed. Saunders, EEUU.

- Rossi, J. 2006. Biology and Husbandry. p. 25-41. *In* D. Mader. Reptile Medicine and Surgery. 2nd. ed. Saunders, EEUU.
- Saif, Y.M. 2003. Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State Press, EEUU.
- Sand, M.A., K.S. Latimer, C.R. Gregory, P.M. Rakich, E. Jacobson & K.E. Pennick. 2004. Molecular diagnosis of paramyxovirus infection in snakes using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction and complementary deoxyribonucleic acid: ribonucleic acid in situ hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:442-448.
- Savage, J. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas. 1ra ed. University of Chicago Press, EEUU
- Solórzano, A. 2004. Serpientes de Costa Rica: Distribución, taxonomía e historia natural. *In* Bio, Costa Rica.
- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J.P. Noordhuizen, & K. Frankena. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec.* 148, 567-572.
- Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Vol. 15. Elsevier, Holanda.
- Tizard, I. 1995. *Inmunología veterinaria*. 4ta ed. McGraw-Hill, EEUU
- Villegas, P. 2000. Avian virus diseases: Laboratory Manual. The University of Georgia. EEUU.
- West, G., M. Garner, J. Raymond, K.S. Latimer & R. Nordhausen. 2001. Meningoencefalitis in a boelen's python (*Morelia boeleni*) associated with paramyxovirus infection. *J. Zoo Wildl. Med.* 32: 360-365.

7. ANEXOS

Anexo 1. Serpientes muestreadas por número de identificación, serpentario de procedencia, y especie.

ID	Serpentario	Especie
1	ICP	<i>Crotalus simus</i>
2	ICP	<i>Crotalus simus</i>
3	ICP	<i>Crotalus simus</i>
4	ICP	<i>Crotalus simus</i>
5	ICP	<i>Crotalus simus</i>
6	ICP	<i>Crotalus simus</i>
7	ICP	<i>Crotalus simus</i>
8	ICP	<i>Crotalus simus</i>
9	ICP	<i>Crotalus simus</i>
10	ICP	<i>Crotalus simus</i>
11	ICP	<i>Crotalus simus</i>
12	ICP	<i>Crotalus simus</i>
13	ICP	<i>Crotalus simus</i>
14	ICP	<i>Crotalus simus</i>
15	ICP	<i>Crotalus simus</i>
16	ICP	<i>Crotalus simus</i>
17	ICP	<i>Crotalus simus</i>
18	ICP	<i>Crotalus simus</i>
19	ICP	<i>Crotalus simus</i>
20	ICP	<i>Crotalus simus</i>
21	ICP	<i>Crotalus simus</i>
22	ICP	<i>Crotalus simus</i>
23	ICP	<i>Crotalus simus</i>
24	ICP	<i>Crotalus simus</i>
25	ICP	<i>Crotalus simus</i>
26	ICP	<i>Crotalus simus</i>
27	ICP	<i>Crotalus simus</i>
28	ICP	<i>Crotalus simus</i>
29	ICP	<i>Crotalus simus</i>
30	ICP	<i>Crotalus simus</i>
31	ICP	<i>Crotalus simus</i>
32	ICP	<i>Crotalus simus</i>
33	ICP	<i>Crotalus simus</i>
34	ICP	<i>Crotalus simus</i>
35	ICP	<i>Crotalus simus</i>

36	ICP	<i>Crotalus simus</i>
37	ICP	<i>Crotalus simus</i>
38	ICP	<i>Crotalus simus</i>
39	RH	<i>Bothrops asper</i>
40	RH	<i>Bothrops asper</i>
41	RH	<i>Crotalus simus</i>
42	RH	<i>Crotalus simus</i>
43	RH	<i>Bothrops asper</i>
44	RCR	<i>Bothriechis schlegelii</i>
45	RCR	<i>Bothriechis schlegelii</i>
46	RCR	<i>Bothriechis lateralis</i>
47	RCR	<i>Bothriechis lateralis</i>
48	RCR	<i>Bothriechis schlegelii</i>
49	RCR	<i>Lachesis stenophrys</i>
50	RCR	<i>Lachesis stenophrys</i>
51	RCR	<i>Lachesis stenophrys</i>
52	RCR	<i>Atropoides picadoi</i>
53	RCR	<i>Bothriechis schlegelii</i>
54	ZSB	<i>Crotalus simus</i>
55	ZSB	<i>Bothriechis schlegelii</i>
56	ZSB	<i>Bothriechis schlegelii</i>
57	ZSB	<i>Bothriechis schlegelii</i>
58	ZSB	<i>Bothriechis schlegelii</i>
59	ZSB	<i>Bothriechis lateralis</i>
60	ZSB	<i>Bothriechis lateralis</i>
61	ZSB	<i>Cerrophidion godmani</i>
62	ZSB	<i>Cerrophidion godmani</i>
63	SM	<i>Bothriechis lateralis</i>
64	SM	<i>Bothriechis lateralis</i>
65	SM	<i>Cerrophidion godmani</i>
66	SM	<i>Cerrophidion godmani</i>
67	SM	<i>Atropoides picadoi</i>
68	SM	<i>Atropoides picadoi</i>
69	SM	<i>Crotalus simus</i>
70	SM	<i>Crotalus simus</i>
71	SM	<i>Crotalus simus</i>
72	SM	<i>Crotalus simus</i>
73	SM	<i>Crotalus simus</i>
74	ICP	<i>Bothrops asper</i>
75	ICP	<i>Bothrops asper</i>
76	ICP	<i>Bothrops asper</i>

77	ICP	<i>Bothrops asper</i>
78	ICP	<i>Bothrops asper</i>
79	ICP	<i>Bothrops asper</i>
80	ICP	<i>Bothrops asper</i>
81	ICP	<i>Bothrops asper</i>
82	ICP	<i>Bothrops asper</i>
83	ICP	<i>Bothrops asper</i>
84	ICP	<i>Bothrops asper</i>
85	ICP	<i>Bothrops asper</i>
86	ICP	<i>Bothrops asper</i>
87	ICP	<i>Bothrops asper</i>
88	ICP	<i>Bothrops asper</i>
89	ICP	<i>Bothrops asper</i>
90	ICP	<i>Bothrops asper</i>
91	ICP	<i>Bothrops asper</i>
92	ICP	<i>Bothrops asper</i>
93	ICP	<i>Bothrops asper</i>
94	ICP	<i>Bothrops asper</i>
95	ICP	<i>Bothrops asper</i>
96	ICP	<i>Bothrops asper</i>
97	ICP	<i>Crotalus simus</i>
98	ICP	<i>Crotalus simus</i>
99	ICP	<i>Crotalus simus</i>
100	ICP	<i>Crotalus simus</i>
101	SG	<i>Atropoides picadoi</i>
102	SG	<i>Atropoides picadoi</i>
103	SG	<i>Bothrops asper</i>
104	SG	<i>Bothrops asper</i>
105	SG	<i>Bothrops asper</i>
106	SG	<i>Bothrops asper</i>
107	SG	<i>Bothriechis lateralis</i>
108	SG	<i>Atropoides mexicanus</i>
109	SG	<i>Atropoides picadoi</i>
110	SG	<i>Bothrops asper</i>
111	SG	<i>Cotalus adamanteus</i>
112	SG	<i>Crotalus adamanteus</i>
113	SG	<i>Bothrops asper</i>
114	P1	<i>Bothriechis schlegelii</i>
115	P1	<i>Bothriechis schlegelii</i>
116	P1	<i>Bothriechis schlegelii</i>
117	P1	<i>Bothriechis schlegelii</i>

118	P1	<i>Bothriechis lateralis</i>
119	P1	<i>Bothriechis lateralis</i>
120	P1	<i>Bothriechis lateralis</i>
121	P1	<i>Bothriechis lateralis</i>
122	MS	<i>Bothrops asper hyp</i>
123	MS	<i>Bothrops astper hyp</i>
124	MS	<i>Bothrops asper</i>
125	MS	<i>Atropoides mexicanus</i>
126	MS	<i>Bothrops asper</i>
127	MS	<i>Crotalus simus</i>
128	MS	<i>Crotalus simus</i>
129	MS	<i>Crotalus simus</i>
130	MS	<i>Crotalus simus</i>
131	MS	<i>Crotalus adamanteus</i>
132	MS	<i>Crotalus adamanteus</i>
133	MS	<i>Crotalus adamanteus</i>
134	MS	<i>Crotalus vegrandis</i>
135	MS	<i>Crotalus vegrandis</i>
136	MS	<i>Crotalus vegrandis</i>
137	MS	<i>Lachesis stenophrys</i>
138	ZSB	<i>Bothriechis lateralis</i>
139	ZSB	<i>Bothriechis lateralis</i>
140	P2	<i>Bothriechis lateralis</i>
141	P2	<i>Bothriechis lateralis</i>
142	P2	<i>Pothridium nasutum</i>
143	P2	<i>Crotalus simus</i>
144	P2	<i>Crotalus simus</i>
145	P2	<i>Bothrops asper</i>
146	P2	<i>Crotalus simus</i>
147	P2	<i>Atropoides picadoi</i>
148	P2	<i>Crotalus simus</i>
149	P2	<i>Crotalus simus</i>
150	P2	<i>Bothrops asper</i>