



PROTOZOOS GASTROINTESTINALES EN *BOTHROPS ASPER* (VIPERIDAE) MANTENIDAS EN EL CENTRO PARA INVESTIGACIONES Y RESPUESTAS EN OFIDIOLOGÍA (CEREO). ESCUELA DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

Nivia Ríos-Carrera¹⁻², Hollys Vásquez²⁻³, Víctor Martínez Cortes²

1. Departamento de Microbiología y Parasitología, Escuela de Biología - Universidad de Panamá.

2. Centro para Investigaciones y Respuestas en Ofidología (CEREO), Escuela de Biología - Universidad de Panamá.

3. Departamento de Zoología, Escuela de Biología – Universidad de Panamá.

E-mail: toxogondii@gmail.com

RESUMEN

En este estudio descriptivo, investigamos los protozoos gastrointestinales en 47 ejemplares de *Bothrops asper* (22 hembras y 25 machos); obteniendo 39 de los ejemplares infectados (83%); 16 hembras (73%) y 23 machos (92%). El sarcodino más frecuente es *Entamoeba invadens*, 18 ejemplares (38%) lo presentaron. Se confirmó la presencia de los siguientes 6 flagelados diferentes: *Enteromonas* sp. (34%), *Chilomastix* sp. (25%), *Retortamonas* sp. (25%), *Giardia* sp. (15%), *Pentatricomonas* sp. (2%), y *Frenzelina* sp. (2%). A los "coccidios" *Cryptosporidium*, *Caryospora*, *Cyclospora* e *Eimeria* los registramos en 7 machos (28%) y 4 hembras (18%), siendo el índice por esta parasitosis 23% en la población total. En los ejemplares parasitados, 25% presentaron poli parasitismo, es decir, estaban infectados por 4 o más géneros de parásitos; 36% menos de 4; y 19% por 1 género. En relación a parasitosis por zonas geográficas y provincias (primer dígito para la zona y el segundo para cada provincia), la zona/provincia 4/8 presentó el mayor índice de ocurrencia (23%); las zonas/provincias 4/5 y 3/7, 17% respectivamente; y 11% en la zona/provincia 3/6. Los menores índices registrados corresponden a las zonas/provincias: 2/4 (4%) y 2/9 (8%).

PALABRAS CLAVES

Protozoos, *Bothrops*, parásitos, flagelados, coccidios

ABSTRACT

In this descriptive study, we investigate gastrointestinal protozoa in 47 *Bothrops asper* (22 females and 25 males) and found 39 positive (83%), 16 females (73%) and 23 males (92%). Positive for *Entamoeba invadens* were 18 specimens (38%), the most frequent protozoan found. In addition, we found the following six flagellates; *Enteromonas* sp. (34%), *Chilomastix* sp. (25%), *Retortamonas* sp. (25%), *Giardia* sp. (15%), *Pentatrichomonas* sp. (2%), and *Frenzelina* sp. (2%). The "coccidian" *Cryptosporidium*, *Caryospora*, *Cyclospora*, and *Eimeria* was confirmed in 7 males (28%) and 4 females (18%), total index for this parasitizes in this population was 23%. In parasitized specimens, 25% had polyparasitism (infected by 4 or more parasite genera); 36% less than 4, and 19% of 1 genus. In relation to the parasites per zone, 4/8 showed the highest level of occurrence (23%), 4/5 and 3/7, 17% each; and 3/6 11%. Finally, 2/9 (8%) and 2/4 (4%) have the lowest index registered.

KEYWORDS

Protozoos, *Bothrops*, parasites, flagellates, coccidian

INTRODUCCIÓN

Los reptiles son utilizados como modelos en investigaciones biomédicas para conocer sobre fisiología cardiovascular, toxicología ambiental, biología evolutiva y reproductiva, enfermedades transmitidas por vectores, y por otros parásitos; también como fuente para la obtención de venenos (serpientes), lo cual impacta en medicina humana. Estos vertebrados se encuentran disponibles a través de programas para cría en cautividad o mediante la captura de ejemplares silvestres. Los representantes del primer grupo suelen estar libres de parásitos, los últimos pueden albergar amplia gama de organismos tanto comensales como parásitos. Por lo tanto, las personas involucradas en el cuidado y/o uso de reptiles en biomédica, investigación, y enseñanza deben estar familiarizados con la fauna parasitaria de estos animales (Baker, 2007).

Ningún otro hospedero como los anfibios y reptiles, ofrecen las ventajas de manipulación experimental en el campo y laboratorio, u otros hábitats. Estas ventajas han permitido a los parasitólogos y

ecologistas utilizar sistemas reptil–parásito como modelos para enseñar parasitología (Smyth & Smyth, 1980).

Luego de la revisión bibliográfica, podemos asegurar que para Panamá se tienen escasos registros sobre las especies que parasitan habitualmente los ofidios o serpientes silvestres. Reconociendo esta deficiencia, decidimos realizar una investigación que nos permitiera determinar la presencia de protozoos gastrointestinales en las *Bothrops asper* mantenidas en el Centro para Investigaciones y Respuestas en Ofidiología (CEREO), ubicado en la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de especímenes

Estos ejemplares provienen de algunas de las zonas/provincias en las que el ofidiólogo Víctor Martínez Cortés dividió el país (no publicado). Primer dígito corresponde a la zona, y el segundo a la correspondiente provincia.

Zona 1: Bocas de Toro (1), la vertiente del Caribe en Veraguas (9), Colón (3), Guna Yala, San Blas (10), y norte de Darién (5).

Zona 2: Chiriquí (4), y vertiente del Pacífico en Veraguas (9).

Zona 3: Los Santos (7), Herrera (6), y Coclé (2).

Zona 4: Panamá (8), y vertiente del Pacífico en Darién (5).

Los especímenes empleados en nuestra investigación provenían específicamente de las siguientes zonas/provincias: 4/8 Panamá, 4/5 Darién, 3/7 Los Santos, 3/6 Herrera, 2/9 Veraguas y 2/4 Chiriquí.

Todos los ejemplares atrapados en campo (información de ingreso en la correspondiente etiqueta adherida a cada caja), son mantenidos vivos en el serpentario del CEREO; en caso de fallecimiento son mantenidos en congelación, y la etiqueta en los archivos para este fin. Todos los ejemplares, según tamaño, son alimentados con ratas y ratones (neo natos, juveniles, y adultos) suministrados por el Bioterio de la Universidad de Panamá.

En el presente estudio algunos ejemplares de *B. asper* que Urriola & Mack utilizaron en su tesis 2010 (sin publicar), también fueron investigados con el objetivo de determinar únicamente protozoarios.

Recolección y análisis de muestras

Las deposiciones fueron recolectadas semanalmente con ayuda de una paleta de madera y colocadas en envases plásticos de boca ancha y tapa rosca. Las *Bothrops asper* son mantenidas en cajas de plástico con tapadera y orificios para aireación; en cada etiqueta, adherida a la caja, esta consignada la codificación estándar para cada espécimen. Para cada muestra recolectada se adicionó información sobre el estado físico de la deposición al momento de la recolección, fecha, datos del ejemplar (talla y peso) y el nombre del recolector. Las muestras obtenidas fueron preservadas en formalina 7 % (Hendrix & Robinson, 2012; Zajac & Conboy 2012).

Montaje Directo

Con palillos de madera se coloca una pequeña cantidad de la muestra ya preservada sobre una gota de la solución de MIF (mertiolate – yodo- formalina); lugol o solución salina, homogenizándola y cubriéndola con un cubre objetos, evitando la formación de burbujas para su posterior observación al microscopio.

Técnica de Willys Molloy

Se mezcló 1 g de materia fecal con 3 - 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio homogenizando vigorosamente con ayuda de un vórtex, luego se rellenó con la misma solución hasta el borde del tubo formando un menisco invertido y se colocó sobre este un cubreobjeto durante 10 a 15 minutos. Pasado este tiempo, el cubreobjeto es colocado sobre una gota de solución de lugol para su observación directa al microscopio (Zajac & Conboy, 2012).

Tinción de Ziehl-Neelsen modificada para *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora* (Método de Kinyoun).

La materia fecal de los especímenes sospechosos de presencia de coccidios fueron extendidas en porta-objetos, en un área de aproximadamente 1.5 cm de diámetro; dejando secar la preparación y posteriormente fijándola con metanol por 10 minutos. La coloración se

realizó con carbol-fucsina concentrada por 20 minutos, y lavábamos 2 minutos con agua corriente. Decolorábamos con ácido sulfúrico 7%, para lavar durante 2 minutos con agua corriente. El colorante de contraste fue verde de malaquita 5% por 2 minutos. Finalmente lavábamos con agua corriente durante 1 minuto y secábamos a temperatura ambiente antes de observar al microscopio (Botero, 1998).

Tinción con Giemsa

Pre coloración: Sumergíamos durante 1 segundo en azul de metileno fosfatado y escurriamos sobre papel toalla, secándolos en posición vertical.

Para la coloración colocábamos invertido al porta-objetos con la muestra de heces, encima de una superficie cóncava. Se desliza solución acuosa de Giemsa recién preparada por debajo del portaobjetos, hasta que se llena todo el espacio. Dejamos actuar el colorante entre 6 a 10 minutos y se aclaró con agua corriente. Se dejó secar en posición vertical y se observó al microscopio (Hendrix & Robinson, 2012; Zajac & Conboy, 2012).

RESULTADOS

De 47 ejemplares de *Bothrops asper* estudiados, el 83% (39 ejemplares) se encontraban parasitados por diversos protozoos. De ese total parasitado, 73% (16 ejemplares) de las 22 hembras y 93% (23 ejemplares) de los 25 machos, y solo 17% de la población no presentó parasitismo (Fig. 1).

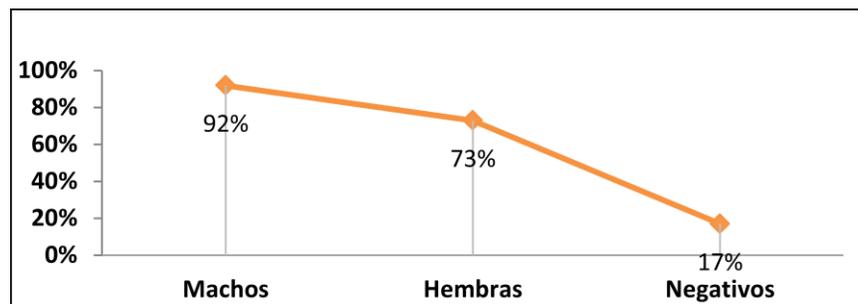


Fig. 1 Porcentaje de parasitosis en población de *Bothrops asper* mantenidas en cautiverio en el Centro de Investigaciones y Respuestas en Ofidología (CEREO).

De las 22 hembras estudiadas, 6 eran sub adultas, y 5 de ellas (83%) resultaron parasitadas. La hembra sub adulta no parasitada equivale al 17%. De las 16 hembras adultas examinadas, 11 se encontraron parasitadas (69%) y 5 resultaron negativas (31%) (Fig. 3).

De los 25 machos de *B. asper* examinados, 7 eran sub adultos, 6 de ellos estaban parasitados (86%). El macho sub adulto que resultó negativo representa 14%. De los 18 machos adultos, 17 estaban parasitados (94%). El ejemplar macho adulto no parasitado representa 6% (Fig. 3).

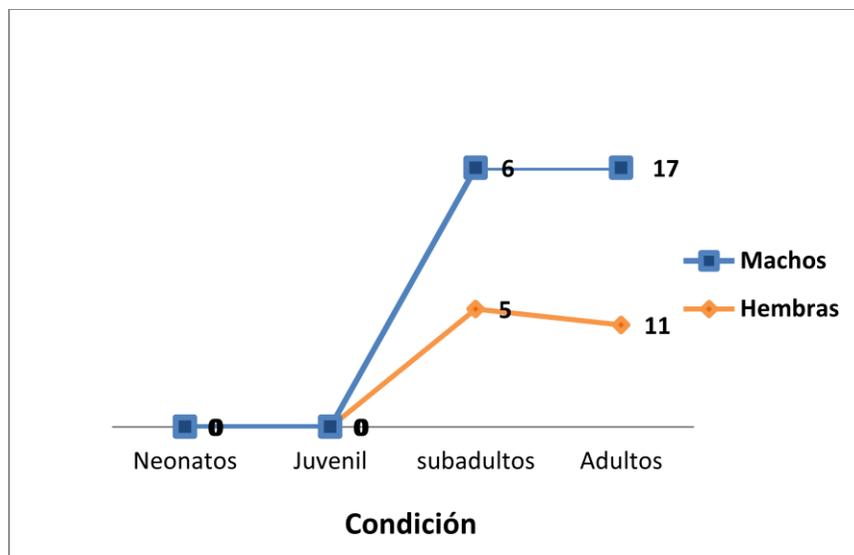


Fig. 3 Parasitosis en ejemplares de *B. asper* según su condición.

La zona geográfica 4/8 presentó el mayor índice de ocurrencia (23%); para las zonas 4/5 y 3/7 registramos 17% respectivamente; y para la zona 3/6 el índice fue 11%. Los menores índices registrados corresponden a las zonas 2/9 con 8%, y la zona 2/4 presenta 4%. Fig. 4.

Entamoeba invadens resultó ser el parásito más frecuente (18 ejemplares positivos) representando el 38% de la población total. *Entamoeba* sp., y *Entamoeba hartmanni* fueron registradas parasitando

13 ejemplares (28%). Del grupo flagelados *Chilomastix* sp., fue registrado en 12 ejemplares lo que equivale al 26% de la población total en estudio.

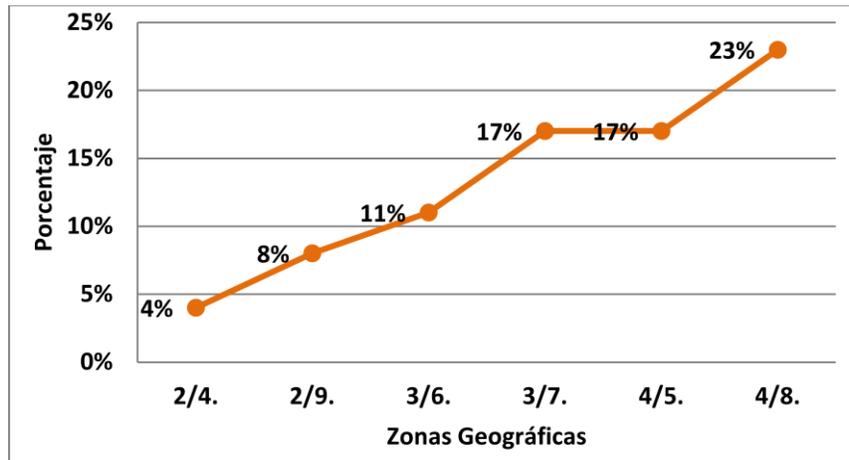


Fig. 4 Comparación del porcentaje de parasitismo en *B. asper* según la zona geográfica de República de Panamá donde fue capturada.
2/4 Chiriquí; 2/9 Veraguas; 3/6 Herrera; 3/7; Los santos4/5; Darién; 4/8 Panamá.

Por su parte, *Enteromonas* sp. se presentó en 34% de la población. *Giardia* sp. se encontró parasitando 15% de la población (7ejemplares). Mientras que 26% (12 ejemplares) de la población total estaba parasitada por *Retortamonas* sp., *Pentatricomonas* sp., y *Frenzelina* sp., presentándose en un solo representando un 2% de la población estudiada. Figura 2.

Los “coccidios” (*Cryptosporidium*, *Caryospora*, *Cyclospora*, y *Eimeria*) los registramos en 23% de la población. *Eimeria* sp. y *Caryospora* sp. fueron reportadas en un solo ejemplar, representando solo el 2% de la población analizada. Por su parte, *Isospora* sp. fue encontrada parasitando el 20% de la población total. Figura 2.

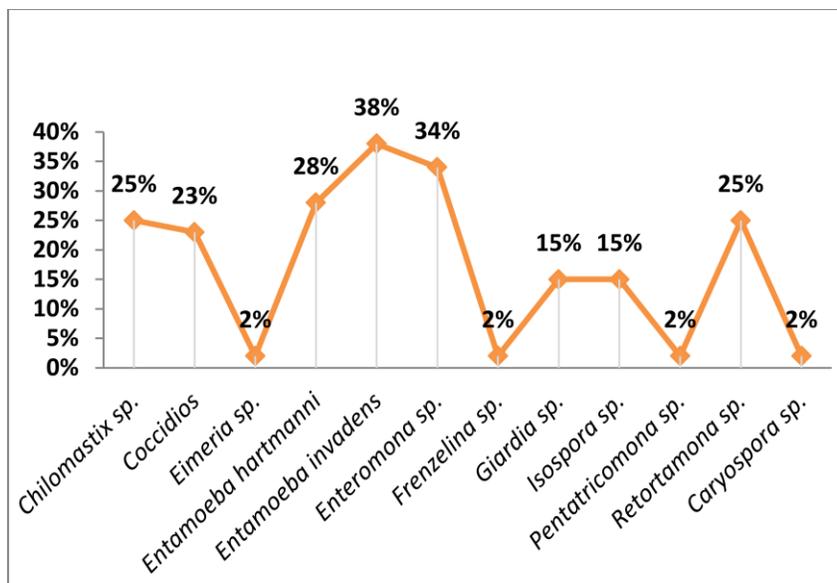


Fig. 2 Espectro parasitario en ejemplares de *Botrops asper* mantenidas en cautiverio en el Centro de Investigaciones y Respuestas en Ofidiología (CEREO).

El 26% de la población presentó poli parasitismo, es decir infección por miembros de 4 o más géneros parasitarios; 36% con menos de 4 géneros; y mono parasitismo en solo el 19% de la población estudiada.

DISCUSIÓN

Estudios realizados por Urriola y Mack (2010) con 70 ejemplares de *Bothrops asper* mantenidas también en la Cuarentena del CEREO les permitieron reportar 40 ejemplares parasitados, de los cuales el porcentaje por *Entamoeba* sp., fue 20%; y por coccidios 17%. Contrario a lo reportado por Urriola y Mack, en nuestro estudio el parasitismo por *Entamoeba* fue mayor: 38% por *E. invadens* y 23% por *E. hartmanni*. También para coccidios, registraron mayor porcentaje (23%).

Johnstone (1998) considera que el parasitismo es el trastorno más común en el sistema digestivo de reptiles, y que los protozoos son únicos entre estos parásitos ya que se multiplican de manera que pueden abrumarlos. Nosotros lo hemos podido comprobar, ya que los protozoos están presentes en 39 de los 47 ejemplares utilizados en nuestro estudio. Este autor reporta que los especímenes más susceptibles son los juveniles y adultos, cuyo sistema inmune ha sido comprometido de alguna manera. Nuestros resultados corroboran lo relativo a la población de adultos, ya que encontramos 69% de hembras adultas parasitadas, y en machos adultos el 95% presentaban algún tipo de parasitosis.

Entamoeba invadens fue el parásito con mayor incidencia, ya que dio positivo en 38% de la población. Barnard & Upton (1994) consideran a este parásito como de mayor importancia clínica ya que infecta a quelonios y serpientes, lo que hemos podido comprobar en la población de *B. asper* utilizada en esta investigación. El estudio de Urriola & Mack (2010, no publicado) demuestra que la infección por *Chilomastix* sp., fue de 3 %; sin embargo nosotros encontramos que *Chilomastix* sp., parasitaba 25% de la población total; por lo tanto, consideramos que este parásito ha incrementado su presencia en la población de *B. asper* mantenida en el CEREO.

Registramos que *Enteromonas* sp. estuvo presente tanto en 8 machos como 8 hembras, lo cual representa 34% de la población total; mientras que *Retortamonas* sp. obtuvo prevalencia de 25% lo que es comparable con estudios realizados por Keymer (1981), cuando informó sobre diferentes flagelados. Por su parte, Baker (2007) concluye que estos flagelados registrados para reptiles son morfológicamente similares a los observados en otros vertebrados. *Giardia* sp. se encontró en 15% de la población total, y pensamos que pudo ser adquirida mediante los roedores utilizados para la alimentación. Urquhart (1996) menciona a *Giardia* sp., que ha sido reportada en animales tanto silvestres como domésticos.

Pentatricomona sp. no ha sido reportada en reptiles por otros investigadores, sin embargo resulta interesante que hayamos obtenido prevalencia del 4% en la población utilizada para esta investigación.

Mcallister *et al.* (1995) realizaron estudios con 435 miembros de las familias Leptotyphlopidae, Colubridae, Elapidae, y Viperidae colectados en distintas localidades de Arkansas, Nuevo México; Oklahoma y Texas, logrando positivos por coccidios. Oppliger (1996) por su parte, al realizar estudios con serpientes, reportó la presencia de coccidios en ellas. Nosotros también hemos confirmado que los siguientes coccidios (*Cryptosporidium*, *Caryospora*, *Cyclospora*, y *Eimeria*) están presentes en 23% de la población total estudiada.

En la presente investigación el sporozoo *Eimeria* sp. se encontró presente en 4% de la población estudiada, mientras que estudios realizados por O'Donoghue (1995), y Brownstein *et al.* (1972), al evaluar 50 animales para detectar la presencia de sporozoos, determinaron al género *Cryptosporidium* spp., en 73 y 89% de la población estudiada. Según Fayer (2004) y Arcay & Bruzual (1993) *Cryptosporidium* sp. ha sido identificado en diferentes hospedadores, incluyendo mamíferos, aves, reptiles y peces; inclusive en el sistema respiratorio de aves. Otros autores que han realizado reportes de coccidios en reptiles son Asmundsson *et al.* (2001) el cual describió para Ecuador a tres nuevas especies de *Eimeria* y dos de *Isospora*. Telford (1973) para Panamá, reportó 8 especies de coccidios parasitando saurios; y Seville *et al.* (2005), describe para Guatemala las 6 siguientes especies: *Caryospora bothriechis*, *C. coniophanis*, *C. conophae*, *C. guatemalensis*, *C. mayorum*, y *C. zacapensis*. Nosotros reportamos un 2% de la población parasitada por *Caryospora* sp.

REFERENCIAS

Arcay, L. & E. Bruzual. 1993. *Cryptosporidium* en ríos de Venezuela. Encuesta Epidemiológica de una población humana y fauna en convivencia. Parasitología al Día. 17: 11 -18.

Asmundsson, I.M., S.J. Upton & P.S. Liberado. 2001. Cinco nuevas especies de coccidios (Apicomplexa: Eimeriidae) de serpientes colúbridos del Ecuador. J. Parasitol. 87(5):1077-81.

Baker, D.G. 2007. *Flynn's Parasites of Laboratory Animals. 2a Ed.* Blackwell Pub. 840 pp.

Barnard, S.M. & S.J. Upton. 1994. *A Veterinary Guide to the Parasites of Reptiles*. Vol.1. *Protozoa*. Krieger Pub. Co. Malabar, FL. 154 pp.

Botero, D. 1998. *Parasitosis Humana. 3a Ed.* CIB. Medellin. Colombia. 462 pp.

Brownstein, D.G., J.D. Standberg, R.J. Montali, M. Bush & J. Fortner. 1972. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Vet. Pathol.* 14:606–617.

Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126:37-56.

Hendrix Ch. & Robinson E. 2012. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. 4ed. Elsevier Inc. 392 pp.

Johnstone, C. 1998. *Parasites and parasitic diseases of domestic animals*. Edu. Univ. Penn. (on line book).

Keymer, I.F. 1981. Protozoa, En: *Diseases of the Reptilia*. Vol. 1. Cooper J. E. & Jackson O.F. (Eds.) Acad. Press, London. Pp. 233–290.

Mcallister, C.T., S.J. Upton, S.E.T. Dixon Jr. 1995. Coccidian parasites (Apicomplexa) from snakes in the Southcentral and Southwestern United States: New host and geographic records. *J. Parasitol.* 81(1): 63-68.

O'Donoghue, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *J. Parasitol.* 25:139-195.

Oppliger, A., M.L. Celerier & J. Clobert. 1996. Physiological and behavioral changes in common lizards parasitized by hemogregarines. *J. Parasitol.* 113:433–438.

Seville, R.S., I.M. Asmundsson & J.A. Campbell. 2005. Descriptions of six new species of *Caryospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Guatemalan snakes (Serpentes: Colubridae and Viperidae). *J. Parasitol.* 91(6):1452-1458.

Smyth, J. & M. Smyth. 1980. Frogs as host-parasite systems I. An introduction to parasitology through the parasites of *Rana temporaria*, *R. esculenta* and *R. pipiens*. MacMillan Press, London. 112 pp.

Telford Jr., S.R. 1973. The malarial parasites of *Anolis* species (Sauria: Iguanidae) in Panama. *Int. J. Parasitol.* 4(1):91-102.

Urquhart, G.M., J. Armour & J.L. Duncan. 1996. *Veterinary Parasitology*. 2ed. Blackwell Pub. 110 pp.

Urriola, Y. & M. Mack. 2010. Parasitismo digestivo y sanguíneo en las *Bothrops asper ingresadas* a la Cuarentena para ofidios en la Universidad de Panamá. Tesis de grado para Licenciatura. 110 pp.

Zajac A. & Conboy G. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8ed. Willey-Blackwell Pub. 354 pp.

Recibido febrero de 2017, aceptado mayo de 2017.