

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

**Estudio anátomo-histopatológico de la enfermedad de  
cuerpos de inclusión de los boidos (BIBD) remitidos al  
Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional en  
un periodo de 1989 al 2009.**

**Modalidad: Tesis de grado**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el  
Grado Académico Licenciatura en Medicina  
Veterinaria**

**Andres Moreira Soto**

**Campus Presbítero Benjamín Núñez**

**Heredia, Costa Rica**

**2010**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

**Estudio anatómo-histopatológico de la enfermedad de cuerpos de inclusión de los boidos (BIBD) remitidos al Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional en un periodo de 1989 al 2009.**

Dr. Jorge Quirós, DMV, PhD.  
Decano de la facultad de Ciencias de la Salud

---

Dra. Laura Castro, DMV.  
Directora

---

Dr. Juan Alberto Morales, DMV.  
Tutor

---

Dr. Mario Baldi Salas, DMV.  
Lector

---

Dra. Rocío González Barrientos, DMV.  
Lector

---

## **DEDICATORIA**

A todos aquellos veterinarios que aman la vida silvestre e intentan conservarla.

A mis padres, mis abuelos y mi hermano por todo el respaldo que me han dado para lograr mis objetivos. A mi tío por su invaluable ayuda en toda mi carrera. A mi novia Ana M. por todo su apoyo.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Juan Alberto Morales, por haberme incentivado a realizar un trabajo tan gratificante como lo es la patología. Al Dr. Udo Hetzel, por toda la ayuda brindada.

Mi agradecimiento al Dr. Mario Baldi, por su guía en todo el trabajo y por toda su vital ayuda siempre.

Agradezco al personal del Servicio de Patología, a la Ing. Laura Alvarado y al Sr. Bernal Valerio, por su ayuda en la búsqueda y procesamiento de muestras.

A la Dra. Rocío González, por haber aceptado ser mi lectora y por su ayuda.

A Ana María por su asesoramiento en el orden del documento.

A todas las personas que colaboraron en el presente trabajo.

## RESUMEN

La enfermedad de cuerpos de inclusión de los boidos (BIBD) es una enfermedad mortal que afecta este grupo taxonómico. Se cree que el agente causal pertenece a la familia de los retrovirus. Un total de 32 boidos pertenecientes a las especies: *Boa constrictor*, *Corallus annulatus*, *Python morulus* y *Python curtus*, remitidos al Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, fueron estudiados histopatológicamente con el objetivo de observar la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en sus órganos y tejidos. El estudio incluyó casos desde 1989 hasta el 2009. Con esta información, se estimó una prevalencia de la enfermedad de 37.5%. El análisis de estadística descriptiva mostró que el sistema nervioso central, hígado, riñón, páncreas, bazo y testículo, fueron clasificados como ideales a la hora de buscar las inclusiones con un 100% de positividad. Intestino, estómago, pulmones (80-50%) y corazón (12.5%) fueron clasificados respectivamente como órganos regulares y malos a la hora de encontrar las inclusiones. Acorde con la prevalencia encontrada y los hallazgos histopatológicos se puede reportar la enfermedad en Costa Rica.

## ABSTRACT

Boid inclusion body disease (BIBD) is a fatal disease which affects only boids as a taxonomic group. It is believed that the causal agent belongs to the family of retrovirus pathogens. A total of 32 boids belonging to the following species: *Boa constrictor*, *Corallus annulatus*, *Python morulus* and *Python curtus* were brought to the Pathology Laboratory at Universidad Nacional, Costa Rica for their analysis. They were analyzed by histopathology techniques and we searched for intracellular inclusion bodies throughout their organs and tissues. The study included cases from a 20 years' time period (1989-2009). We estimated a total prevalence of 37.5%. A simple descriptive statistic model showed the following results: central nervous system, liver, kidney, pancreas, spleen and testicles were organs classified as ideal to find inclusion bodies routinely with a 100% of positivity. Organs like intestine, stomach, lungs (80-50%) and heart (12.5%) were classified as regular or bad tissues, respectively, to search for intracellular inclusion in comparison to the ideal organs. According to our findings and the prevalence reported, Costa Rica should be classified as BIBD positive country.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
<i>1.1.1. Biología y clasificación taxonómica</i> .....	<b>1</b>
<i>1.1.2. Anatomía de los boidos</i> .....	<b>5</b>
<i>1.1.3. Enfermedad de cuerpos de inclusión</i> .....	<b>9</b>
1.1.3.1. Historia y etiología .....	9
1.1.3.2. Síntomas .....	13
1.1.3.3. Prevalencia y distribución .....	15
1.1.3.4. Diagnóstico de BIBD .....	16
1.1.3.5. Examen postmortem .....	17
1.1.3.6. Histología .....	17
1.1.3.7. Diagnósticos diferenciales .....	18
1.1.3.8. Tratamiento .....	19
1.1.3.9. Prognosis .....	19
1.1.3.10. Prevención .....	19
<b>1.2. Justificación</b> .....	<b>20</b>
<i>1.2.1. Importancia</i> .....	20
<b>1.3. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
<i>1.3.1. Objetivo General</i> .....	24
<i>1.3.2. Objetivos Específicos</i> .....	24
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1. Análisis estadístico</b> .....	<b>27</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Casos de enfermedad de cuerpos de inclusión</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2. Análisis de frecuencia para los sujetos positivos a BIBD.</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3. Estudio de los órganos de los animales positivos a BIBD.</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. Hallazgos histopatológicos</b> .....	<b>36</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 1.</b> Distribución por especie de las 32 serpientes analizadas.....	28
<b>Figura N° 2.</b> Distribución por edad de las 32 serpientes analizadas.....	29
<b>Figura N° 3.</b> Distribución por sexo de las 32 serpientes analizadas.....	30
<b>Figura N° 4.</b> Prevalencia total de serpientes analizadas.....	31
<b>Figura N° 5.</b> Inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas en todo el parénquima (páncreas 40x).....	36
<b>Figura N° 6.</b> Inclusiones intracitoplasmáticas en túbulos renales junto a cristales de uratos (riñón 60x).....	37
<b>Figura N° 7.</b> Las flechas muestran inclusiones en los túbulos renales (riñón 60x).....	37
<b>Figura N° 8.</b> Las flechas muestran inclusiones intracitoplasmáticas de diferente tamaño, además de una severa lipidosis (hígado 40x).....	38
<b>Figura N° 9.</b> Inclusiones intracitoplasmáticas en epitelio bronquial. La flecha muestra la única inclusión en el campo (pulmones 40x).....	39
<b>Figura N° 10.</b> Inclusiones intracitoplasmáticas en tejido nervioso. Ampliado se observa una inclusión en una neurona (cerebro 60x).....	40
<b>Figura N° 11.</b> Inclusiones intracitoplasmáticas en células foliculares (tiroides 60x). ....	41



**Figura N°12.** Inclusiones intracitoplasmáticas en células de la retina. Ampliado para mostrar detalles de la inclusión (ojo 40x).....41

**Figura N°13.** Inclusiones intracitoplasmáticas en los túbulos seminíferos (testículo 60x).....42

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N°1.</b> Sintomatología clínica reportada en las 12 serpientes positivas a BIBD.....	32
<b>Cuadro N° 2.</b> Asociación entre edad y positividad del total de los individuos estudiados.....	33
<b>Cuadro N°3.</b> Asociación entre sexo y positividad del total de los individuos estudiados.....	34
<b>Cuadro N°4.</b> Número de animales positivos al BIBD y órganos positivos y negativos para cada individuo.....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

#### *1.1.1. Biología y clasificación taxonómica*

Las serpientes, dentro del grupo de los reptiles, son el segundo grupo con mayor diversidad animal, incluyéndose más de 2900 especies, que se distribuyen en casi todos los continentes excepto la Antártica (Zug et al., 2001). Estos reptiles son extremadamente diversos en forma, tamaño y texturas. Esta diversidad hace que este grupo sea muy variado en términos de morfología, lo cual es claramente reflejado en sus adaptaciones a diferentes nichos ecológicos, al igual que, su comportamiento y fisiología (Savage, 2002). Las serpientes se caracterizan por ser fundamentalmente depredadores de otros vertebrados (Zug et al., 2001).

Se han registrado en el país 137 especies de serpientes, ocupando diferentes hábitats desde el nivel del mar hasta los 3000 metros de altura (Savage, 2002; Solórzano, 2004).

Este grupo de vertebrados se ubica en la Clase Reptilia, prosigue dentro del Orden Squamata y en adelante se agrupa en el Suborden serpientes (Savage, 2002; Solórzano, 2004), que se subdivide en 2 infraórdenes, cada uno de ellos conteniendo varias familias:

#### Suborden Serpientes

1. Scolecophidia (serpientes ciegas)
  - a. Anomalepididae\*
  - b. Leptotyphloidae\*
  - c. Typhlopidae\*
2. Alethinophidia
  - a. Acrochordidae

- b. Aniliidae
- c. Anomochilidae
- d. Atractaspididae
- e. Boidae (Boas)\*
- f. Bolyeriidae
- g. Colubridae (ratoneras, corredoras)\*
- h. Cyndrophidae
- i. Elapidae (cobras, corales)\*
- j. Loxocemidae\*
- k. Pythonidae (pitones)
- l. Tropicophiinae\*
- m. Uropeltidae
- n. Viperidae (serpientes de foseta)\*
- o. Xenopeltidae

\*Familias de serpientes presentes en Costa Rica.

Dentro del territorio costarricense, alrededor de 92% de las especies de serpientes están asociadas a las regiones tropicales y subtropicales, que están entre 0 y 1500 msnm (Savage, 2002). Solamente un 8% de las especies, ocupan zonas templadas frías y boreales, por encima de los 1500 msnm (Solórzano, 2004).

Dentro de la Familia Boidae, en Costa Rica, se encuentran las siguientes especies: *Boa constrictor*, *Corallus annulatus*, *Corallus ruschenbergerii* y *Epicrates cenchria* (Savage, 2002; Solórzano, 2004).

En el territorio costarricense, principalmente en zonas rurales, se crían y reproducen en cautiverio varias especies de fauna silvestre, entre ellas, los reptiles y anfibios, que incluyen no solo especies autóctonas, sino además, especies exóticas como la *Python spp.* (Hernandez, 1999).

Los miembros de la familia boidae, son serpientes catalogadas como primitivas por sus características anatómicas, poseen dientes premaxilares y presentan remanentes de pelvis y extremidades posteriores en forma de garras o espolones a cada lado de la abertura anal (Orti et al., 2004). Los miembros de esta familia son vivíparos con excepción de las pitones y la especie *Charina reinhardtii* (Solórzano, 2004). Su dentición es aglifa, y en muchos casos los dientes maxilares y mandibulares están muy desarrollados. Además, hacen uso de su fuerza muscular por medio de la constricción, para inmovilizar a sus presas (Savage, 2002; Solórzano, 2004).

Dentro del género *Boa*, solo un representante, la *Boa constrictor*, se encuentra en el neotrópico. Esta serpiente, posee las escamas lisas y no presenta fosetas labiales (Solórzano, 2004).

La *Boa Constrictor* es una serpiente de tamaño grande, que alcanza la longitud máxima reportada de hasta 5 metros, aunque en Costa Rica no se han registrado ejemplares mayores a 3.8 metros. El promedio usual de tamaño en adultos oscila en 2 a 2.25 metros (Solórzano, 2004). El cuerpo es robusto; la cabeza es grande, ancha y bien diferenciada del cuello; el perfil dorsal del hocico es ligeramente recortado y la cola es corta. Los ojos son de tamaño mediano y la pupila es elíptica verticalmente. Su coloración varía desde tonos amarillos pálidos, a grises o cafés en el fondo, con una serie de diseños o bandas irregulares café oscuro a rojizo, mientras que, posteriormente estos diseños se vuelven ovalados (Savage, 2002; Solórzano, 2004).

La *Boa constrictor* es una especie terrestre y arborícola y puede ser activa en cualquier momento, aunque su mayor periodo de actividad se registra durante el crepúsculo o la noche. Es capaz de buscar lugares óptimos para esperar y asechar a sus presas (Solórzano, 2004). Utiliza la constricción como método de inmovilización de sus presas, que después son tragadas completas empezando por la cabeza. Como respuesta defensiva, produce un sonido de aire muy fuerte y en general se muestra dispuesta a morder si se le molesta o intenta capturar (Solórzano, 2004).

Su alimentación consiste en una gran variedad de mamíferos, de pequeño a mediano tamaño, incluyendo roedores, prociónidos como los pizotes, primates pequeños, ardillas y murciélagos, reportándose a los felinos silvestres como ocelotes e inclusive venados juveniles como presas inusuales; además de, diversas especies de aves y lagartijas, así como, perros y aves de corral (Solórzano, 2004).

Esta especie es catalogada como vivípara, y se conocen partos de hasta 65 crías, las cuales, nacen midiendo 40-55 cm de largo. La época de apareamiento se extiende desde agosto hasta abril y los nacimientos de abril a septiembre. Además, la gestación dura aproximadamente de 4 a 8 meses (Solórzano, 2004).

En cuanto a su hábitat, este se distribuye desde México hasta Argentina, incluyendo algunas islas de las Antillas Menores (Solórzano, 2004). En Costa Rica, se extiende desde los bosques lluviosos, secos tropicales y subtropicales de ambas vertientes y del valle central, desde el nivel del mar hasta 1500m de altitud; incluyéndose la isla del Caño en el pacífico sur (Solórzano, 2004).

Dentro del otro grupo de boidos de Costa Rica, además de la *Boa Constrictor*, se encuentra reportado el género *Corallus*, que incluye a dos especies: *C. annulatus* y *C. ruschenbergerii* (Savage, 2002). La *C. annulatus* es una serpiente de tamaño mediano a grande, con una longitud máxima conocida de 1.60 metros. El cuerpo es relativamente

delgado o puede ser moderadamente robusto, con la cabeza grande, ancha y bien diferenciada del cuello, el perfil dorsal del hocico ligeramente recortado y la cola relativamente larga. Presenta fosetas labiales bien desarrolladas en ambas mandíbulas. Su coloración es muy vistosa, con un patrón de diseños irregulares dorsales que forman ocelos o manchas oscuras. Los dientes maxilares están bien desarrollados. Esta serpiente es principalmente arborícola y de actividad nocturna. En general ocupa partes altas de los árboles, a veces a la altura del dosel. Utiliza los mismos métodos de caza y defensa descritos para la *Boa constrictor* (Savage, 2002; Solórzano, 2004).

Su dieta es variada e incluye mamíferos pequeños como roedores, ardillas y murciélagos, así como, aves y lagartijas (Solórzano, 2004).

El género *Corallus* también es clasificado como vivíparo, y con partos de hasta 13 crías. Los apareamientos ocurren entre diciembre y febrero y los nacimientos entre julio y noviembre. El período de gestación varía entre seis o siete meses. Los neonatos miden 42 a 47 cm de longitud total (Solórzano, 2004).

Esta serpiente es poco común, pero, su distribución varía desde Guatemala hasta Colombia. En Costa Rica, se distribuye en los bosques lluviosos tropicales y subtropicales de la vertiente del Caribe, desde el nivel del mar hasta 1000 msnm (Solórzano, 2004).

### *1.1.2. Anatomía de los boidos*

#### 1.1.2.1. Sistema tegumentario

El tegumento consiste en, epidermis en sus capas más externas y dermis en sus capas internas. La epidermis, incluyendo su estrato corneo, está totalmente cubierta por escamas. En serpientes, el crecimiento epidermal es discontinuado, por lo que, existe un

ciclo de ecdisis preestablecido. Los reptiles poseen muy pocas glándulas asociadas al tegumento, por lo que, se dice que el tegumento es de tipo seco. Una membrana basal separa la epidermis de la dermis, dentro de la dermis existe un complejo sistema pigmentario que consiste en melanóforos, xantóforos e iridóforos (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.2. Sistema músculo-esquelético

Las serpientes se diferencian de otros grupos taxonómicos en que, poseen un cuerpo alargado, cilíndrico, carente de apéndices o extremidades, existiendo restos pélvicos muy rudimentarios en algunas de ellas (Savage, 2002). La locomoción se lleva a cabo mediante ondulaciones laterales del cuerpo, en movimientos rectilíneos, látero-lineales y en concertina (Savage, 2002). La columna vertebral posee alrededor de 120 a 320 vertebrae precloacales, cada una se articula con una costilla a cada lado, formando así, un tubo cilíndrico que alberga los órganos internos (Jacobson, 2006). Distintos segmentos vertebrales se interconectan mediante músculos esqueléticos axiales (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.3. Sistema digestivo

Este sistema contiene estructuras desde la cavidad oral hasta la cloaca, y está compuesto por los mismos órganos que en mamíferos. La lengua de las serpientes es elongada, muscular, aglandular y se localiza en una funda debajo de la glotis. El esófago lleva alimento al estómago y su región posterior la componen numerosas células caliciformes. Los boidos presentan la particularidad de tener tejido linfoide asociado en las tonsilas esofágicas. El esófago de las serpientes es delgado en su parte anterior y más muscular en su parte caudal al corazón, esto debido a sus hábitos alimenticios. El estómago de las serpientes es elongado, linear y sin saculaciones. Luego de transitar por el estómago, la ingesta se mueve al intestino delgado, el cual, es típicamente linear y carece



de criptas. Posteriormente, la ingesta pasa al colon. En la unión del intestino delgado con el colon se puede observar un ciego en las pitones. Las heces producidas en el colon, viajan a la cloaca, donde se une el sistema digestivo y urogenital (Jacobson, 2006).

El hígado es elongado y aplanado en las serpientes, y se encuentra asociado al pulmón en su superficie dorsocraneal. La vena portal y hepática dividen el hígado en dos lóbulos. La vesícula biliar se encuentra caudal al hígado y está asociada al páncreas y el bazo. Histológicamente, el hígado no está organizado en lóbulos, y presenta cúmulos de melanomacrófagos. El páncreas es de forma triangular, y presenta su porción exocrina y endocrina, aunque su división no está tan delimitada como en mamíferos. En los boidos el lóbulo dorsal del páncreas está conectado al lóbulo central por un istmo y está asociado al bazo (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.4. Sistema respiratorio

Este sistema está dividido en tracto alto y bajo. El tracto respiratorio alto lo compone la nariz, la cual, se encuentra asociada al órgano vomeronasal. El tracto respiratorio bajo lo conforman la glotis, laringe, tráquea, bronquios y pulmones. Los boidos presentan los dos pulmones bien diferenciados en contraste con otras serpientes, estos órganos son elongados y unidos caudalmente a un saco aéreo que termina en el hígado craneal (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.5. Sistema urinario y reproductor

Está compuesto por un par de riñones y uréteres. Los riñones son elongados, lobulados y se localizan caudal en la cavidad celómica. Los uréteres depositan en una abertura separada en la cloaca. Las serpientes no poseen vejiga urinaria (Jacobson, 2006).

Un par de gónadas se encuentran en el medio posterior de la cavidad celómica. La hembra posee dos ovarios y dos úteros. En el macho, los testículos son redondos, y se encuentran localizados entre el páncreas y los riñones, además, este posee dos hemipenes, de los cuales, introduce solo uno a la vez durante la copula para la fecundación (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.6. Sistema cardiovascular

En todas las serpientes el corazón se localiza craneal al hígado. Éste se compone de seno venoso, atrios derecho e izquierdo y un único ventrículo. Todos los reptiles poseen dos aortas, izquierda y derecha (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.7. Sistema endocrino

La glándula tiroides se encuentra anterior al corazón asociada al timo y está implicada en el ciclo de ecdisis y el crecimiento. Algunas especies poseen dos glándulas tiroides, otras solo una. Por lo general, las dos glándulas paratiroides están muy relacionadas con el timo. Las glándulas adrenales se encuentran cerca de las gónadas (Mader, 2006).

#### 1.1.2.8. Órganos de los sentidos

Los ojos no tienen parpados, estos se fusionan en una membrana transparente formando el lente o espéculo que cubre la cornea. La forma y orientación de la pupila varía según el modo de vida y hábitat de cada especie (Savage, 2002).

Los boidos poseen termorreceptores especializados en el borde de la mandíbula y se denominan fosetas labiales (Jacobson, 2006).

#### 1.1.2.9. Sistema nervioso

El cerebro de las serpientes posee procencéfalo (donde se encuentran los desarrollados bulbos olfatorios), telencéfalo (cerebro), diencéfalo (talamos e hipotálamo), mesencéfalo (tectum óptico) y rombencéfalo (cerebro posterior, puente, cerebelo y medula oblongada). Además poseen los 12 pares de nervios craneales. Las serpientes poseen un órgano pineal, el cual, actúa como regulador del comportamiento, termorregulación, coloración y actividad sexual (Jacobson, 2006).

#### 1.1.3. Enfermedad de cuerpos de inclusión

##### 1.1.3.1. Historia y etiología

La enfermedad de cuerpos de inclusión o BIBD, por sus siglas en inglés, es la patología infecciosa más importante que afecta boidos y pitones (Jacobson et al., 2001; Mader, 2006). Es una enfermedad altamente contagiosa y fatal para cualquier individuo susceptible que la contraiga (Hetzl et al., s.f.). El primer reporte fue en los Estados Unidos en los años setentas, observándose primariamente, en boidos de colecciones privadas y zoológicos alrededor del mundo (Jacobson, 2006). Se caracteriza por producir inclusiones intracitoplasmáticas en casi todos los órganos del animal, principalmente observadas en los epitelios viscerales y células neuronales (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.).

Aunque todas las especies de la familia boidae pueden ser susceptibles a la enfermedad, las especies más comúnmente diagnosticadas son las *Boa constrictor* y la pitón burmesa (*Python morulus bivittatus*), probablemente por su popularidad en las

tiendas de mascotas y por las condiciones en las que son criadas en cautiverio (Mader, 2006).

Solamente los miembros de la familia Boidae han sido diagnosticados con BIBD, sin embargo, otras especies de reptiles pueden actuar como portadores del agente o pueden manifestar signos clínicos muy variados de esta enfermedad en comparación con los miembros de la familia Boidae, además, pueden permanecer sin diagnóstico clínico (Raymond et al., 2001; Mader, 2006; Vancraeynest et al., 2006).

Esta patología puede afectar individuos de cualquier edad, incluyéndose neonatos, juveniles y adultos, por lo que, la edad no es un factor determinante en la gravedad ni en la presentación de la enfermedad (Hetzl et al., s.f.).

En la subfamilia boinae la *Boa constrictor*, anaconda verde (*Eunectes murinus*), boa haitiana (*Epicrates striatus*), Boa arborícola anillada (*Corallus annulatus*); y en la familia pithonidae, la Pitón Burmesa (*Python morulus*), Pitón Reticulada (*Python reticulatus*) y Pitón Bola (*Python regius*) además, las pitones australianas (*Morelia spilota variegata* y *Morelia spilota spilota*) y recientemente la especie *Corallus hortulanus* (Hetzl et al., s.f.), son las especies que hasta ahora se han reportado como las más afectadas por esta enfermedad (Hetzl et al., s.f.).

Las inclusiones intracelulares son descritas como agregados de material electrodenso, sin membrana en el caso de inclusiones más pequeñas (2  $\mu\text{m}$  aprox.). Cuando son más grandes (5-6  $\mu\text{m}$ ), se observan fragmentos membranosos junto con agregados granulares de material electrodenso. Dichas inclusiones varían de tamaño, y contienen una proteína característica 68 kDa. (Wozniak et al., 2000; Huder et al., 2002; Garner & Raymond, 2004; Hetzel et al., s.f.). La formación de estas inclusiones sugiere que provienen de la sobreproducción o de la poca degradación de algún componente viral que se acumula en el citoplasma del huésped, o un material previral necesario para la

replicación del mismo, en cualquier caso no es claro su origen (Wozniak et al., 2000; Jacobson et al., 2001).

El agente etiológico no ha sido evidenciado aún, pero por sus características de infección y comportamiento de la enfermedad, puede estar asociado con un agente tipo retroviral, por lo que, se reconoce como el posible agente causal (Wozniak et al., 2000; Vancraeynest et al., 2006; Mader, 2006; Hetzel et al., s.f.). Otras etiologías como el Reovirus y Paramixovirus han sido discutidos como posibles agentes de la enfermedad, sin embargo, la ausencia de evidencia hace pensar que otros agentes virales podrían estar involucrados (Hetzel et al., s.f.). Además, se ha postulado que pueden existir diferentes cepas de este virus (Mader, 2006). En algunos estudios se observaron partículas virales con características de retrovirus tipo C (Wozniak et al., 2000; Raymond et al., 2001; Mader, 2006). Estas partículas se han podido encontrar en tejidos afectados de serpientes bajo aislamiento viral y microscopia electrónica (Huder et al., 2002; Mader, 2006).

Schumacher et al. (1994) reportó partículas parecidas a virus, por medio de microscopía electrónica en tejidos de boas infectadas, dichas partículas tenían un diámetro de 110 nm y una nucleo-cápside hexagonal.

Partículas con características similares se reportaron en cultivos celulares de riñón de tres boas constrictor (*Boa constrictor subespecies*) y una pitón burmesa (*Python morulus bivittatus*), las cuales, presentaban BIBD. La inoculación de dos pitones burmesas con el cultivo celular infectado dio como resultado, signos clínicos observados en los animales con BIBD. Además, lograron observar inclusiones intracitoplasmáticas características, sin embargo, no se reportaron partículas virales en las células de estos animales (Schumacher et al., 1994).

Wozniak et al., (2000) inoculó boas sanas con un macerado de hígado de una boa diagnosticada con BIBD; 10 semanas después, todos estos animales presentaban

inclusiones típicas para BIBD (número moderado a bajo de inclusiones de aproximadamente 1 a 2  $\mu\text{m}$ ). Un hallazgo relevante del estudio fue el aumento en número y el diámetro de las inclusiones intracelulares a través del tiempo. El diámetro máximo de estas inclusiones se observó a las 32 semanas post infección y eran de 5-6  $\mu\text{m}$ . Wozniak et al. (2000) además reportaron partículas parecidas a las estructuras típicas de un retrovirus en todas las boas inoculadas experimentalmente. A pesar de todos los hallazgos microscópicos asociados a BIBD, ningún animal inoculado presentó signos clínicos asociados al BIBD, inclusive un año después de la inoculación. Consecuentemente ninguna de las investigaciones hasta la fecha logró cumplir los postulados de Kock (Wozniak et al., 2000).

Los retrovirus son agentes virales relativamente comunes en serpientes, los cuales, han sido reportados en asociación con tumores (Zeigel & Clark, 1969; Chandra et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006), pero además, estos mismos agentes han sido encontrados en animales sanos sin causar patologías asociadas (Huder et al., 2002).

El retrovirus e inclusiones intracelulares han sido encontrados juntos en el mismo animal, y en otros casos, inclusive ambas partículas dentro de la misma célula, pero la relación entre las dos entidades no ha sido bien establecida (Wozniak et al., 2000).

La epidemiología de esta enfermedad, continúa siendo un misterio. Actualmente, la transmisión directa del BIBD no se ha logrado, pero existe evidencia de una rápida propagación en colecciones de serpientes infectadas, lo que, sugiere que es una enfermedad de diseminación rápida. Las serpientes infectadas normalmente presentan infestaciones de la garrapata *Ophionyssus natricis*, lo cual, sugiere que la transmisión vectorial es muy probable, sin embargo, esto no ha sido evidenciado hasta la fecha (Schumacher et al., 1994; Wozniak et al., 2000; Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006; Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.). Las formas de transmisión reportadas son contacto horizontal,

vertical (transovárico en serpientes ovíparas, transplacentario en serpientes vivíparas) y la transmisión venérea (Hetzl et al., s.f.).

Síndromes sumamente parecidos a la enfermedad de cuerpos de inclusión, han sido diagnosticados en serpientes que no pertenecen al grupo de los boidos, un caso en una serpiente del maíz, *Elaphe guttattus guttattus* (Flemming et al., 2003), y otro en una serpiente real, *Lampropeltis getulus*, la cual, estuvo en contacto con *Boa constrictor* (Carlisle-Nowak et al., 1998). Al examen histológico se observaron inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en diversos órganos reportados para BIBD, en conjunto con síntomas similares a BIBD, pero no se encontraron o buscaron partículas parecidas a virus, en la microscopía electrónica.

Raymond et al., (2001) describieron la enfermedad en un grupo de vipéridos (*Bothriechis marchi*), en los cuales, la presentación de la enfermedad, síntomas, y distribución de las inclusiones intracitoplasmáticas concuerda con lo observado para BIBD. En microscopía electrónica reportaron inclusiones intracitoplasmáticas con una morfología muy similar a las inclusiones descritas para BIBD, y en algunos casos también partículas electro densas, con características morfológicas similares a los retrovirus.

#### 1.1.3.2. Síntomas

Diversos sistemas y órganos son afectados por BIBD, esto puede causar síntomas sistémicos muy variados, desde los observados en el sistema gastrointestinal, respiratorio y nervioso (Vancraeynest et al., 2006). El primer síntoma en las boas es la regurgitación, seguido por la anorexia (Schumacher et al., 1994; Vancraeynest et al., 2006, Hetzel et al., s.f.). Posteriormente, se dan signos del sistema nervioso como temores de cabeza, desorientación, ataxia, opistótonos y cambios de comportamiento (Schumacher et al.,

1994; Oros et al., 1998; Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.). Además, puede ocurrir paresis, haciendo imposible para la serpiente hacer constricción de su presa (Bennet, 1996). Las serpientes afectadas usualmente presentan infecciones bacterianas secundarias, neumonía, estomatitis ulcerativa, gastritis y osteomielitis como resultado de la severa inmunosupresión (Oros et al., 1998; Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.). Otros signos clínicos asociados incluyen disecdisis, neoplasias como el sarcoma cutáneo y leucemia (Schumacher et al., 1994; Wozniak et al., 2000; Chandra et al., 2001; Jacobson et al., 2001; Garner & Raymond, 2004).

Las serpientes afectadas pueden presentar dermatitis necrótica y osteofitos en las vertebras (Zwart et al., 2001).

Los signos neurológicos progresan, y luego de semanas o meses eventualmente producen la muerte (Schumacher et al., 1994). Esta enfermedad es contagiosa y fatal, siendo la eutanasia la única opción viable, para evitar el esparcimiento de la enfermedad y sufrimiento del animal (Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.).

Los signos clínicos y la progresión de la enfermedad, varían entre boas (subfamilia Boinae) y pitones (Subfamilia pythoniae). Inclusive, pueden existir boas que sean asintomáticas, convirtiéndose en portadores de la enfermedad (Bennet, 1996).

En las pitones esta enfermedad tiene una progresión más rápida que en boas. Además, estos individuos no muestran regurgito crónico y normalmente se encuentran anoréxicas. (Schumacher et al., 1994; Hetzel et al., s.f.). Los signos neurológicos en pitones aparecen más temprano en el curso de la enfermedad, además, son más severos que en las boas lo que podría indicar una mayor susceptibilidad por este grupo a la enfermedad. Los posibles signos clínicos son: la incoordinación, convulsiones periódicas, parálisis de la mitad posterior del cuerpo y posición anormal de la cabeza, entre otros (Schumacher et al.,



1994). Se asume que las pitones pueden ser portadores aberrantes del agente infeccioso (Hetzl et al., s.f.).

#### 1.1.3.3. Prevalencia y distribución

La prevalencia de esta enfermedad es desconocida. En un censo realizado en el Northwest Zoopath, Estados Unidos, por Garner y Raymond (2004) en boidos postmortem, se determinó una prevalencia en subespecies de *Boa constrictor* (menor a 33%) y en *Corrallus annulatus* (28%); la prevalencia determinada para las boas de suelo *Acrantopis spp.*, boas arco iris *Epicrates spp.* y anacondas *Eunectes spp.* fue cercana a 0%. En el estudio no hubo animales positivos dentro de un grupo amplio de pitones examinados (301).

Actualmente no existe información sobre la distribución geográfica o las especies afectadas por el BIBD a nivel mundial, se ha reportado en Boidos en cautiverio y en colecciones de zoológico en Australia (Carlisle-Nowak et al., 1998), Islas Canarias (Oros et al., 1998), Alemania (Zwart et al., 2001), Republica Checa (Knotek et al., 2007), además, Costa Rica posee posibles casos de BIBD (Morales, 2008). Esta enfermedad probablemente se encuentre en todo el mundo y afecte a una cantidad significativa de serpientes (Vancraeynest et al., 2006).

La distribución reportada de esta enfermedad muestra qué tan extensamente el comercio de reptiles puede afectar la distribución de una enfermedad de este tipo (Franke & Telecky, 2001).

#### 1.1.3.4. Diagnóstico de BIBD

El diagnóstico definitivo se logra con la observación de las inclusiones intracitoplasmáticas, en cualquier tipo de células afectadas (Jacobson et al., 2001; Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.).

El diagnóstico idealmente se hace por histología, debido a que la ausencia de respuesta celular es determinante para descartar otras enfermedades virales (Garner & Raymond, 2004). Otra posibilidad es la citología, pero esta técnica puede dar tanto falsos positivos como negativos (Garner & Raymond, 2004).

La biopsia puede ser de utilidad, ya que casi todos los órganos pueden verse afectados. La densidad de inclusiones generalmente es mayor en células epiteliales del hígado, páncreas, riñón y mucosa gástrica. El método más utilizado para el diagnóstico de BIBD es la biopsia percutánea de hígado. Además, se puede utilizar biopsia de mucosa gástrica o de tonsilas, pero esta requiere equipo especial (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006).

Las biopsias de piel son otra posibilidad, sin embargo, son poco sensibles en comparación con la biopsia hepática, se puede aumentar su sensibilidad al obtener más de una biopsia (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006).

Dentro de la citología, en células mieloides de la médula ósea pueden observarse inclusiones, inclusive, buffy coat puede ser utilizado para diagnóstico, pero se ha demostrado que en muchas ocasiones puede llevar a falsos positivos, ya que detritos celulares, agentes infecciosos, o cualquier otro material fagocitado pueden confundirse con las inclusiones intracitoplasmáticas (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006).

Los aspirados percutáneos del hígado presentan una baja sensibilidad diagnóstica, debido a la friabilidad de los hepatocitos. Estos generalmente lisan durante la aspiración, así que, la cantidad de células intactas es escasa. También un examen citológico de un

lavado gástrico presenta problemas y es poco útil para su uso de diagnóstico rutinario (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006).

Se pueden utilizar frotis sanguíneos, teñidos con hematoxilina y eosina, donde se podrían encontrar ocasionalmente inclusiones en eritrocitos y linfocitos, a pesar que, en animales infectados con BIBD, normalmente no se encuentran inclusiones intracelulares a nivel de frotis sanguíneo (Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.).

La microscopia electrónica, como herramienta diagnóstica, reporta estas inclusiones como estructuras electro densas claramente visibles si están presentes, las cuales, son estructuras que van desde partículas sin membrana, a partículas parecidas a retrovirus tipo C (Vancraeynest et al., 2006).

#### 1.1.3.5. Examen postmortem

Las lesiones macroscópicas observadas en casos de BIBD son caquexia, fibrosis pancreática, atrofia y fibrosis del bazo, lesiones nodulares del estómago y el esófago, así como un hígado pálido, con estomatitis ulcerativa y neumonía (Schumacher et al., 1994; Jacobson et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006). Actualmente, el diagnóstico definitivo de esta enfermedad se realiza postmortem, y se basa en la identificación de los cuerpos de inclusión en diversos órganos o células del animal a nivel de análisis histopatológicos (Hetzel et al., s.f.).

#### 1.1.3.6. Histología

El hallazgo histológico más frecuente son las inclusiones intracitoplasmáticas. Además, se han reportado la lipidosis hepática, hepatitis subaguda periportal, vacuolización y degeneración de los hepatocitos y células pancreáticas, depleción linfoide del timo y el

bazo, necrosis de los túbulos renales y neumonía crónica intersticial (Schumacher et al., 1994, Jacobson et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006).

Las serpientes que muestren signos nerviosos, pueden cursar con una meningoencefalitis no supurativa, con degeneración neuronal, gliosis y demielinización (Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006).

Cualquier órgano puede ser usado para la detección microscópica de las inclusiones, el número es mucho mayor en el hígado y el páncreas. Además, se reporta una gran cantidad de inclusiones en tejido nervioso (Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006).

Las inclusiones son observadas en hematoxilina y eosina como eosinofílicas, y en la tinción de Giemsa como azul profundo, no se tiñen con rojo O, PAS, ni Ziehl-Neelsen, (Schumacher et al., 1994).

#### 1.1.3.7. Diagnósticos diferenciales

En un boido con historia de regurgito crónico y signos nerviosos se debe sospechar de BIBD. Sin embargo, hay además otras condiciones que pueden causar signos clínicos similares. La regurgitación puede ser causada por estomatitis, temperatura ambiental inadecuada, intoxicación, septicemia, neoplasia, un cuerpo extraño, amebiasis, criptosporidiosis, tricomoniasis y coccidiosis entre otros (Vancraeynest et al., 2006). La encefalitis en las serpientes puede ser de origen viral, bacteriano, micótico o parasitario, el diagnóstico diferencial más importante para la sintomatología nerviosa es la paramixovirosis, la cual, es una enfermedad viral que puede causar signos respiratorios. Los signos nerviosos pueden ser inclusive compatibles con intoxicación con

organofosforados, los cuales, son usados para control de ectoparásitos (Vancraeynest et al., 2006).

#### 1.1.3.8. Tratamiento

No existe tratamiento para la enfermedad de cuerpos de inclusión, sin embargo, la condición general de las serpientes puede mejorarse con alimentación forzada (Frye, 1993) y con buena terapia de hidratación (Vancraeynest et al., 2006). El único tratamiento es la eutanasia, no solo con el objetivo de bienestar animal, sino además de evitar el esparcimiento de la enfermedad (Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.).

#### 1.1.3.9. Prognosis

Esta enfermedad es incurable y por ende fatal para el individuo afectado, esto incluye aquellos animales aparentemente sanos, en colecciones infectadas. El poder establecer cuales animales están sanos de los enfermos en una colonia con animales infectados, es complicado, pues el largo periodo de pre-patencia de la enfermedad y la ausencia de métodos diagnósticos, no permite esta segregación. Los animales aparentemente sanos no se pueden considerar como tales, sino mas bien se deben considerar animales positivos o portadores de la enfermedad (Vancraeynest et al., 2006).

#### 1.1.3.10. Prevención

Debido a que se desconoce la patogénesis y la epidemiología de la enfermedad, no existe una estrategia para la prevención. Lo que se realiza es aislamiento de los animales recién adquiridos por 6 meses a un año, biopsias de hígado o de tonsilas esofágicas pueden

ser de ayuda, antes de introducir un animal nuevo a la colección (Vancraeynest et al., 2006).

Se debe mantener buenas medidas de aseo e higiene en las colecciones, y de prevención de ectoparásitos para evitar infestaciones de *Ophionyssus natricis*, ya que esta ha sido propuesta como vector de la enfermedad, a pesar de no ser comprobado (Schumacher et al., 1994; Wozniak et al., 2000; Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006; Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.).

Hay grandes oportunidades de diseminación entre los reptiles importados, de individuos enfermos a sanos, o incluso la potencial transmisión de la enfermedad a los de vida silvestre. No existe un período de cuarentena establecido para los reptiles o anfibios en el comercio e importación (Franke & Telecky, 2001).

Otro problema importante se da en las tiendas de mascotas, donde las condiciones de aseo y de ventilación no son las adecuadas, con lo que, la transmisión de parásitos, bacterias o virus es factible (Franke & Telecky, 2001).

## **1.2. Justificación**

### *1.2.1. Importancia*

Dentro del contexto veterinario actual, se hace sumamente necesario el contar con médicos veterinarios capacitados en la atención de fauna silvestre, incluyendo, a la herpetofauna. La atención veterinaria de los reptiles requiere una combinación de los conocimientos básicos utilizados en la medicina de animales de compañía, aunada al estudio especializado de las diferencias presentes entre los reptiles. Además, resulta primordial el hecho de mantenerse actualizado en el estudio de las enfermedades de estas

especies, en su mayoría recientemente descritas. De forma integral la educación de los propietarios constituye un elemento básico en el mantenimiento de la salud de estos animales, se les debe explicar a los mismos la necesidad imperante de proporcionarles un cuidado veterinario estricto (Jacobson, 2006; Mader, 2006).

La tenencia de estos animales en cautiverio se volverá cada vez más importante, debido a que las poblaciones silvestres están disminuyendo por diversos factores (Bartlett & Bartlett, 1997; Mader, 2006).

Costa Rica no es ajeno a la tendencia de “nuevas mascotas” existiendo en el país varias especies miembros de la familia Boidae, que se pueden encontrar en colecciones privadas, zoológicos o en terrarios de exhibición (Solórzano, 2004).

La importancia de definir las causas de muerte de los animales silvestres, a pesar de ser animales en cautiverio, tiene como objetivo tratar de conocer e investigar más en detalle las enfermedades que los afectan, cuáles son los agentes causales, epidemiología y en última instancia sobre el tratamiento de las mismas (Fowler & Miller, 1999; Azpiri et al., 2000; WCS, 2008).

Al conocer más acerca de las causas de muerte, se podrá dar un manejo enfocado en la prevención más que en el tratamiento en colecciones privadas y zoológicos, para así, evitar altas mortandades en estos centros de tenencia animal (Fowler & Miller, 1999; Azpiri et al., 2000; WCS, 2008).

La enfermedad de cuerpos de inclusión es una enfermedad importante en el mundo herpetológico, por el escaso conocimiento de la misma en cuanto a su distribución, origen y transmisión (Vancraeynest et al., 2006). Es una enfermedad capaz de diezmar poblaciones enteras de boidos y pitones bajo condiciones de cautiverio. Esta enfermedad no tiene cura, siendo la principal arma de control, la medicina preventiva (Vancraeynest et al., 2006).

Los reptiles se han convertido en una mascota muy popular alrededor del mundo, y el comercio de estas es una industria que sigue en franco crecimiento. De acuerdo a la Asociación Americana de Fabricantes de Productos para Mascotas (APPMA), en el 2000 más de 3.9 millones de familias en los Estados Unidos poseía por mascotas a reptiles o anfibios, lo que significaba un aumento del 10 % comparándolo con el año 1998. Además, indican que la mayoría de reptiles mascotas son de vida libre, o son hijos de animales que fueron capturados en vida libre. Solo un porcentaje muy bajo de los individuos comercializados, son criados bajo condiciones de cautiverio. De acuerdo a esta misma asociación, el 22 % de estas familias tenía serpientes como mascotas, solo superado por las tortugas, que representaban un 40% (Franke & Telecky, 2001). La *Python regius* se encuentra dentro de las especies más importadas hacia Estados Unidos, esta, junto con la *Boa constrictor*, consisten el 7.2% del total de reptiles importadas en 1997 (Franke & Telecky, 2001).

Las cuatro especies reportadas en Costa Rica de la familia Boidae, son potencialmente portadoras o acarreadoras de la enfermedad, y estos especímenes en cautiverio podrían pasarla a los animales silvestres, favoreciendo el esparcimiento de la enfermedad en el país (Hetzl, 2008).

Otro factor potencial de diseminación de la enfermedad se podría estar dando en las tiendas de mascotas, donde las condiciones de aseo y de ventilación no son las adecuadas, con lo que la transmisión de parásitos, bacterias o virus hacia individuos susceptibles es muy factible (Franke & Telecky, 2001).

Esta enfermedad es fatal, incluso para animales aparentemente sanos. Es imposible determinar la cantidad de enfermos en colecciones infectadas, debido a que, la patogénesis y la transmisión se desconocen, además de su largo periodo de incubación y el hecho de que las boas pueden ser transmisores asintomáticos (Vancraeynest et al., 2006).



El hecho potencial de pérdidas económicas a criadores de estos animales representa un factor económico relevante para estudiar esta enfermedad.

Además, el evitar la introducción de esta enfermedad exótica a animales de vida libre de Costa Rica, al aumentar el conocimiento de esta enfermedad en el país, resulta primordial.

Debido al escaso conocimiento de la enfermedad y sumado a la creciente actividad de crianza, manejo y distribución de estas especies a nivel nacional, adquiere especial relevancia la realización de estudios como el presente, el cual, por medio de la histopatología puede arrojar información en relación con la situación de la enfermedad en el país y aportar conocimiento acerca de la patobiología de la misma.

### *1.2.2. Hipótesis*

La causa de muerte de especies de serpientes de la familia de los Boidos, estudiadas en el Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, está asociada con la enfermedad de cuerpos de inclusión.

### **1.3. Objetivos**

#### *1.3.1. Objetivo General*

- Realizar un estudio retrospectivo de los casos de boidos remitidos al Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, durante el periodo 1989-2009.

#### *1.3.2. Objetivos Específicos*

- 1- Cuantificar el número total de animales positivos a BIBD de los casos de los boidos remitidos al Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en el periodo de 1989 al 2009.
- 2- Determinar si existe diferencia entre los animales infectados con BIBD en cuanto a su especie, edad y sexo.
- 3- Determinar la presencia o ausencia de inclusiones en cada órgano muestreado de los animales infectados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de 32 boidos remitidos al Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria, de la Universidad Nacional, en el período comprendido entre los años 1989 al 2009. Para cada caso bajo estudio, se describieron los hallazgos macroscópicos previamente reportados durante la necropsia, por el Dr. Juan Alberto Morales (Comunicación personal) y los hallazgos microscópicos, los cuales, fueron reanalizados y descritos acorde con la nomenclatura descriptiva actual (Jacobson, 1978; Jacobson, 2006). Se analizaron detalladamente los hallazgos histopatológicos con todas las lesiones congruentes con BIBD.

Se recopiló información relevante de cada individuo, como la especie, edad y sexo entre otros, de los archivos mantenidos en el Departamento de Patología. Para los casos del año 2009, la información anterior, fue recolectada al momento de ser admitido el cadáver al departamento de Patología (Ver anexo N°1). El procedimiento de necropsia utilizado es el descrito por Mader (2006) y fue hecha en el momento que se remitió el caso al Servicio de Patología de la Universidad Nacional. Los casos anteriores a esta fecha, fueron necropsiados acorde con el método usado por Morales 2008 (comunicación personal).

Para todos los casos, se hizo un examen físico externo, para detallar lesiones en cualquier estructura externa, lo cual, fue registrado en los expedientes de necropsia. El procedimiento de apertura del animal se realizó colocando al espécimen en posición dorso-ventral y se realizó una incisión con bisturí o tijeras, sobre la línea media, empezando en la sínfisis mandibular y continuando hasta la cloaca (Mader, 2006).

Se evaluaron todos los aspectos de los órganos internos *in situ*, con el objetivo de determinar cualquier condición anormal, para luego retirar los órganos de la cavidad

celómica (Mader, 2006). Los hallazgos macroscópicos, fueron igualmente registrados en los expedientes de necropsia acorde con el procedimiento estandarizado del Servicio de Patología y acorde con lo descrito por Mader (2006).

Se tomaron muestras para el examen directo, por medio de un raspado de rutina, usando la técnica descrita por (Morales, 2008), con una hoja de bisturí. La muestra fue humedecida con solución salina fisiología al 5% (Alcames®) y analizada en el microscopio de luz (Olympus® modelo BH2, fabricado en Japón) bajo los objetivos de 4X, 10X, 25X y 40X. Los resultados fueron registrados en los expedientes de necropsia.

Las muestras de las lesiones y órganos importantes fueron almacenadas y fijadas en formalina al 10%. Estos tejidos fueron incluidos en parafina, para luego, ser cortados con un micrótopo a un grosor de 4  $\mu$ m, y luego, fueron teñidos con hematoxilina y eosina utilizando técnicas de rutina de histopatología (Roberts & Smail, 2001).

Estas láminas fueron reanalizadas con el objetivo de buscar la enfermedad de cuerpos de inclusión. Un animal fue considerado positivo cuando cualquiera de sus órganos internos presentó inclusiones intracitoplasmáticas compatibles con BIBD. Se reobservó cada lámina de cada caso en particular, utilizando un microscopio de luz, y todos hallazgos relevantes fueron registrados acorde con el procedimiento establecido en el Servicio de Patología.

## 2.1. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de Estadística descriptiva con la información recopilada de los expedientes de cada individuo y de la observación de los órganos de estos (Waine, 2006); Además, se utilizó un análisis multivariado para describir la distribución de frecuencia y para determinar diferencias significativas entre las variables clasificatorias de sexo, especie y edad (Waine, 2006). Se realizó un análisis univariado para determinar la presencia de inclusiones por órgano, y por ende, el porcentaje de animales positivos a la enfermedad de cuerpos de inclusión (Waine, 2006).

Todos los datos recopilados fueron analizados y digitalizados usando una base de datos en el programa Excel® (MS Office 2007®), y los análisis fueron realizados usando el programa SPSS® (<http://www.spss.com/spss/>).

### 3. RESULTADOS

De los 32 individuos evaluados, el 81.2 % (26/32) corresponde a *Boa constrictor*, por lo tanto, esta fue la especie más representativa en este estudio. El 6.2% (2/32) de individuos fueron de la especie *Python curtus* y 6.2% (2/32) fueron individuos de la especie *Python morulus*. El porcentaje que corresponde a *Corallus annulatus* es de un 6.2% (2/32) del total de la población estudiada. Ver figura N°1.

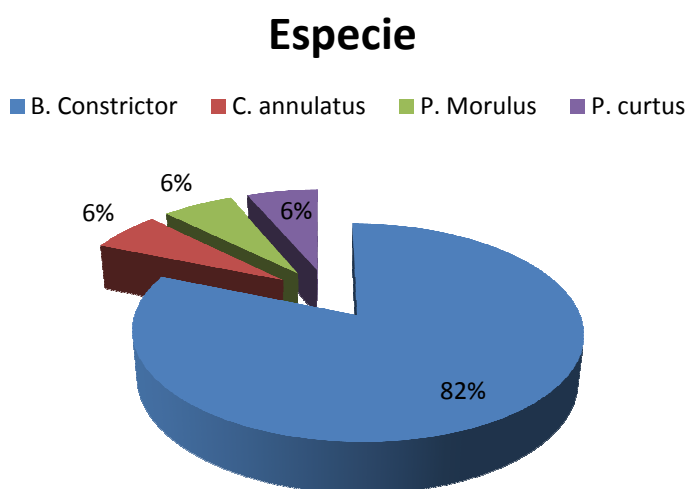


Figura N° 1. Distribución por especie de las 32 serpientes analizadas.

La edad de las serpientes se clasificó en tres categorías, juvenil (menor de un año), adulto (mayor a un año) y no definidas (N.D.) para los casos donde no fue posible establecer la edad con certeza.

Del total de individuos (32), un 15.6% (5/32) fue agrupado como individuos juveniles, los cuales son en su totalidad de la especie *Boa constrictor*. Un 68.7% (22/32), fueron agrupados como adultos. Y finalmente, un 15.6% (5/32) de los animales fue clasificado como no determinado (N.D.).

Dentro de la población clasificada como adulta (22), un 81.8 % (18/22) se identificó como perteneciente a la especie *Boa constrictor*, y el restante 18.1% (4/22) corresponde a las demás especies (dos individuos de la especie *Python morulus* y dos de la especie *Corallus annulatus*).

En el grupo de individuos clasificados como no determinado (N.D.), se estableció una distribución de tres individuos de la especie *Boa constrictor* y dos individuos de la especie *Python curtus*. Ver figura N°2.

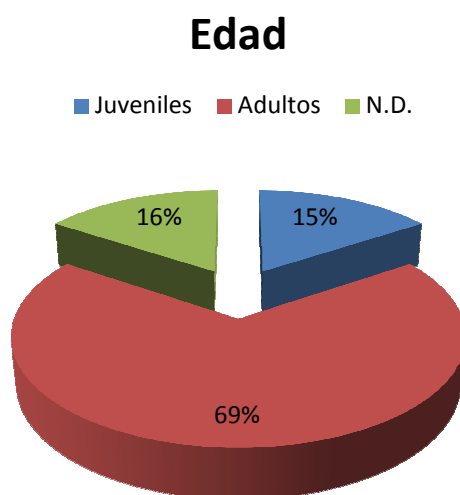


Figura N° 2. Distribución por edad de las 32 serpientes analizadas.

Para la variable de sexo, un 50.0% (16/32) de los individuos fueron clasificados como machos, un 12.5% (4/32) fueron hembras y el restante 38.5% (12/32) de los individuos se clasificaron como sexo no determinado (N.D.), debido a la ausencia de tejido reproductivo o información deficiente en los expedientes de necropsia.

De las especies clasificadas dentro del grupo de los machos, el 75.0% (12/16) de estos individuos fueron identificados dentro de la especie *Boa constrictor*, el grupo restante

correspondió a 6.2% (1/16) de *Python morulus* y el mismo porcentaje para *Python curtus*. Finalmente el 12.5% (2/16) correspondió a la especie *Corallus annulatus*.

Dentro del subgrupo de las hembras, el 75.0% (3/4) correspondió a la especie *Boa constrictor* y un individuo perteneciente a la especie *Python morulus*.

En relación al subgrupo de sexo no determinado, el 91.6% (11/12) correspondió a *Boa constrictor* y el restante 8.3% (1/12) a un individuo de la especie *Python curtus*. Ver Figura N°3.

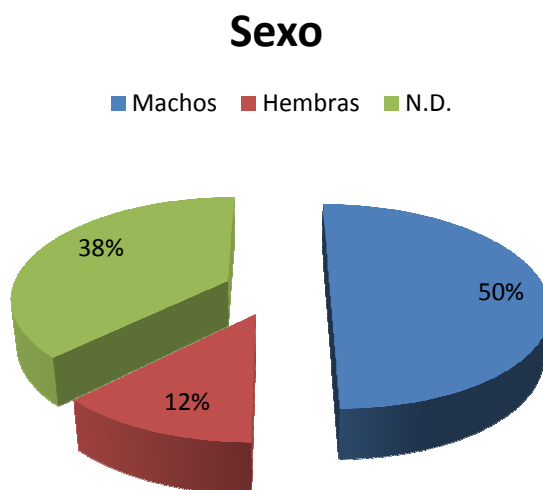


Figura N° 3. Distribución por sexo de las 32 serpientes analizadas.

### 3.1. Casos de enfermedad de cuerpos de inclusión

Un 37.5% (12/32) de los individuos presentaban inclusiones intracitoplasmáticas correspondientes a BIBD en alguno de sus órganos (Jacobson et al., 2001; Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006). Esto representa en términos de prevalencia, que un 37.5% de animales analizados estaban afectados con esta enfermedad. El análisis de



la información presentó que, las especies afectadas por esta enfermedad corresponden a *Boa constrictor* (9/11), *Corallus annulatus* (2/11) y *Python morulus* (1/11). Ninguna de las *Python curtus* analizadas presentó evidencia de inclusiones intracitoplasmáticas que fuesen compatibles con la enfermedad. Si observamos la cantidad de individuos *Boa constrictor* totales (26), esta enfermedad representa un 34.6% (9/26) de prevalencia de BIBD para este subgrupo de serpientes analizadas. Ver Figura N°4.

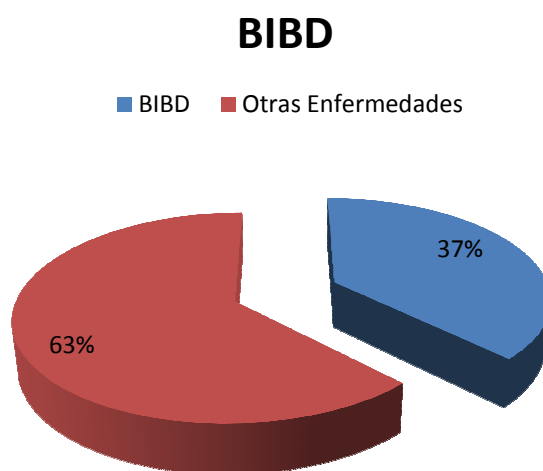


Figura N° 4. Prevalencia total de serpientes analizadas.

Dentro de los casos analizados de animales negativos a BIBD, se reportó que un número de 10 individuos, fueron afectados por otras causas de muerte, clasificadas como de origen infeccioso por ser producidas por un agente etiológico definido, ya sea bacteriano, fúngico o parasitario, esto corresponde a que un 31.2% (10/32) de la población de serpientes total presentaban enfermedades de origen infeccioso.

Los hallazgos histológicos más relevantes, además de la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en los casos positivos a BIBD fueron: degeneración lipídica del hígado, precipitados de uratos (gota visceral), parasitosis en el hígado y tracto digestivo,

con lo cual, un 41.6% (5/12) de los casos positivos presentaron otras alteraciones además de las inclusiones al examen microscópico, y un 58.3% (7/12) de casos positivos no presentaron ninguna alteración evidente ni macroscópicamente durante la necropsia ni al examen microscópico, solamente la sintomatología asociada o la presencia de inclusiones correspondientes con BIBD en la histología.

Del total de individuos positivos a BIBD (12/32), se reportó uno o varios de los signos clínicos, presentados en el cuadro N°1.

**Cuadro N°1. Sintomatología clínica reportada en las 12 serpientes positivas a BIBD**

<b>Sintomatología</b>	<b>Presentación</b>	<b>Total de casos</b>
Sin signos clínicos aparentes		5 casos
Síntomas nerviosos	Incoordinación de movimientos, tiende a morder, ataxia	3 casos
Síntomas gastrointestinales	Anorexia, estomatitis, regurgito	3 casos
Síntomas respiratorios	Secreción nasal, disnea, estertores	1 caso
Síntomas dermatológicos	Disecdisis	1 caso

### **3.2. Análisis de frecuencia para los sujetos positivos a BIBD.**

Solo 27 individuos de los 32 analizados, fueron incluidos en el análisis de frecuencia de edad. Los restantes 5 individuos, fueron excluidos del análisis pues su edad no fue determinada con certeza. Para este análisis un número de 4 individuos de los 5 categorizados como juveniles, un 80% (p: 0.8) presentaban enfermedad de cuerpos de

inclusión. El 36.4% (p: 0.364) de los individuos categorizados como adultos presentaron evidencia de la enfermedad (cuadro N° 2).

**Cuadro N° 2. Asociación entre edad y positividad del total de los individuos estudiados.**

<i><b>BIBD</b></i>	<i><b>Positivos</b></i>	<i><b>Negativos</b></i>	<i><b>Total</b></i>
<b>Juvenil</b>	4	1	5
<b>Adulto</b>	8	14	22
<b>TOTAL</b>			27

El análisis de relación de las variables edad y positividad se realizó usando la prueba del chi-2 (variables categóricas), esta prueba determinó que un 80 % de animales juveniles presentaban BIBD con un intervalo de confianza (IC) de 44.9%-100%. En cuanto al subgrupo de los adultos el resultado fue de 36.4% con un IC de 16.3-56.5%, muy por debajo del porcentaje de positivos juveniles.

Para el análisis de la variable sexo, solo fue posible incluir con certeza a 20 individuos, los 12 individuos restantes fueron excluidos del análisis por ser N.D. Se estimó que un 80% de los animales analizados (16/20) fueron machos y de éstos, el 43.7% (p: 0.437) fueron positivos a BIBD. El restante 20% (4/20), fueron hembras y de estas, solo dos (2/4) es decir, un 50% (p: 0.5) presentaron BIBD de manera clara. En los machos positivos, el test encontró un 43.7% de probabilidad con IC de 19.4-68.1%. En el caso de las hembras, el intervalo de confianza fue muy amplio como para inferir que el sexo presenta alguna diferencia estadísticamente significativa en la presencia de BIBD. Ver cuadro N° 3.

**Cuadro N°3. Asociación entre sexo y positividad del total de los individuos estudiados.**

<i>BIBD</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>
<b>Macho</b>	7	9	16
<b>Hembra</b>	2	2	4
<b>TOTAL</b>			20

### 3.3. Estudio de los órganos de los animales positivos a BIBD.

El presente estudio, al ser retrospectivo, se basó en los órganos colectados durante la necropsia en el momento que el animal llegó al Servicio de Patología de la Universidad Nacional. El cuadro N° 4 resume los órganos analizados.

**Cuadro N°4. Número de animales positivos al BIBD y órganos positivos y negativos para cada individuo.**

<b>Órgano</b>	<b>Total de animales muestreados positivos</b>	<b>Órganos positivos a BIBD</b>	<b>Órganos negativos a BIBD</b>
Cerebro	11	11	0
Hígado	11	9	2
Riñones	9	9	0
Páncreas	9	9	0
Intestino	10	8	2
Pulmones	10	7	3
Bazo	6	6	0
Estómago	9	5	4
Testículo	5	5	0
Corazón	8	1	7
Ojo	1	1	0
Tiroides	1	1	0

Se consideró positivo a BIBD a un animal que presentó inclusiones intracitoplasmáticas en al menos un órgano interno evaluado, sin embargo, cabe mencionar que cada individuo en particular mostró variaciones en cuanto a los órganos que presentaron inclusiones. Sin embargo, el número de órganos positivos brinda la posibilidad de clasificar los órganos por afinidad, agrupándolos en ideales, regulares o malos para tener una mayor probabilidad de encontrar inclusiones celulares asociadas al BIBD.

Los resultados de esta evaluación sugieren que los órganos ideales para encontrar inclusiones son en orden descendente: cerebro, hígado, riñones, páncreas, bazo y testículo. En la mayoría de estos órganos, un 100% presentaron inclusiones intracitoplasmáticas claras y en alto número.

Los tejidos intestinal, pulmonar y estomacal se clasifican como órganos de tipo regulares, en los cuales un < 50-80 % presentaron inclusiones, pero en un número menor en comparación con los órganos ideales y con mayor dificultad de encontrar en el corte histológico.

De los órganos clasificados como malos para llevar a cabo la detección de inclusiones intracitoplasmáticas, únicamente se incluyó el corazón, en el cual, un 12.5% (1/8) de individuos se notó afectado con inclusiones, y en un número inferior en comparación con los clasificados como órganos ideales y regulares.

Además, se encontraron inclusiones en ojo y en tiroides, sin embargo, estas inclusiones fueron difíciles de observar.

### 3.4. Hallazgos histopatológicos

El hallazgo más consistente en casi todos los órganos fue la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas de diversos tamaños, desde pequeñas de unos cuantos micras hasta aquellas que excedían el tamaño del núcleo celular.

Dentro del tejido pancreático las inclusiones fueron observadas dentro del páncreas exocrino (específicamente células acinares) en todas las boas donde este órgano fue muestreado, y con cierta frecuencia en los túbulos pancreáticos. Además, en un caso estas fueron observadas en páncreas endocrino. En algunos individuos se pudo observar cierta atrofia del tejido pancreático. Ver figura N° 5.

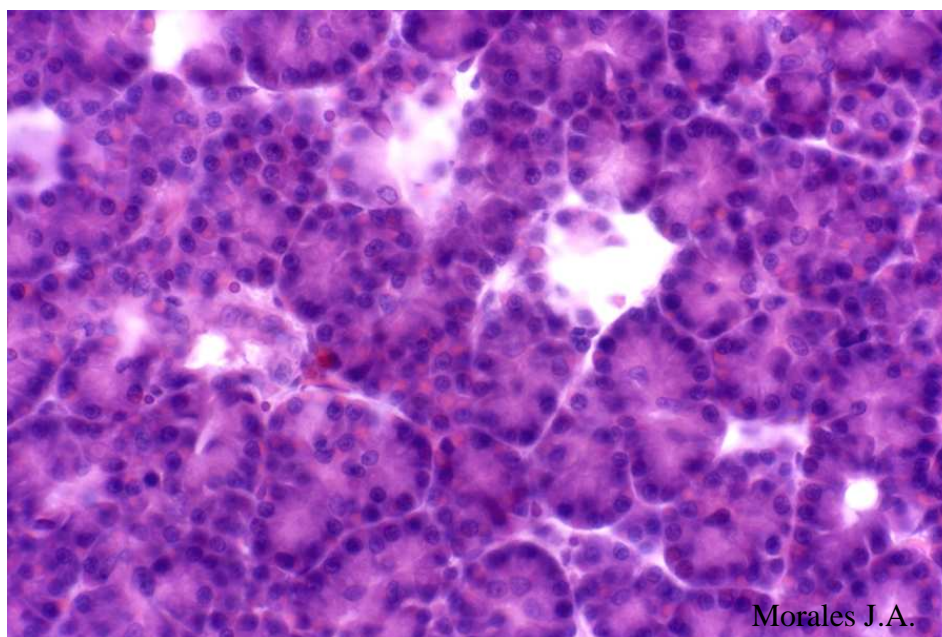


Figura N° 5. Inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas en todo el parénquima (páncreas 40x).

En los riñones las inclusiones se observaron predominantemente en los túbulos proximal y distal (ver figura N° 6 y figura N° 7), además, se encontraron varios animales con inclusiones intracitoplasmáticas en las células epiteliales del glomérulo y uréteres. Uno

de los individuos presentó gota visceral, por lo que, presentó agregados de uratos en este órgano con una reacción tipo granulomatosa asociada.

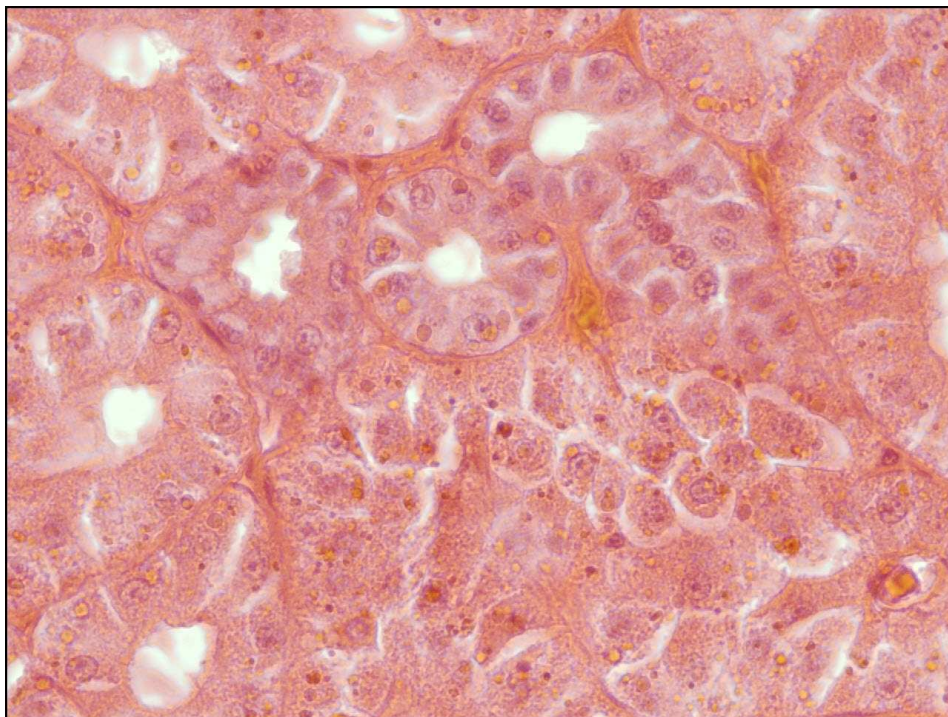


Figura N° 6. Inclusiones intracitoplasmáticas en túbulos renales junto a cristales de uratos (riñón 60x).

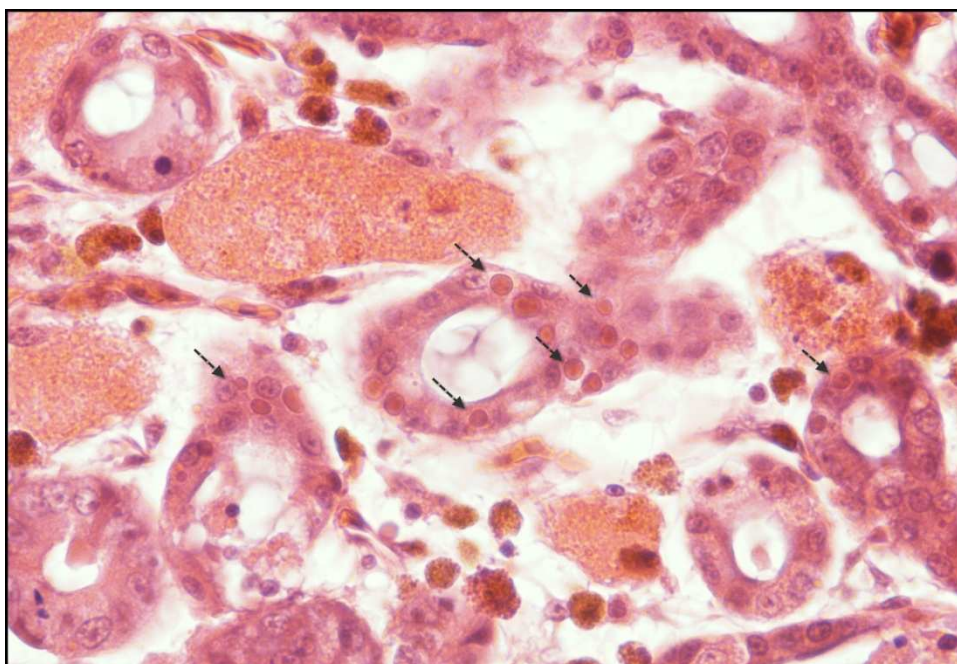


Figura N° 7. Las flechas muestran inclusiones en los túbulos renales (riñón 60x).

El hígado presentó inclusiones en los hepatocitos, además de una clara degeneración lipídica presentada en dos de los casos positivos (ver figura N° 8). Los conductos biliares presentaron inclusiones en sus células epiteliales en menor frecuencia. También se observaron protozoarios no identificados, por lo que, la parasitosis hepática fue un hallazgo ocasional.

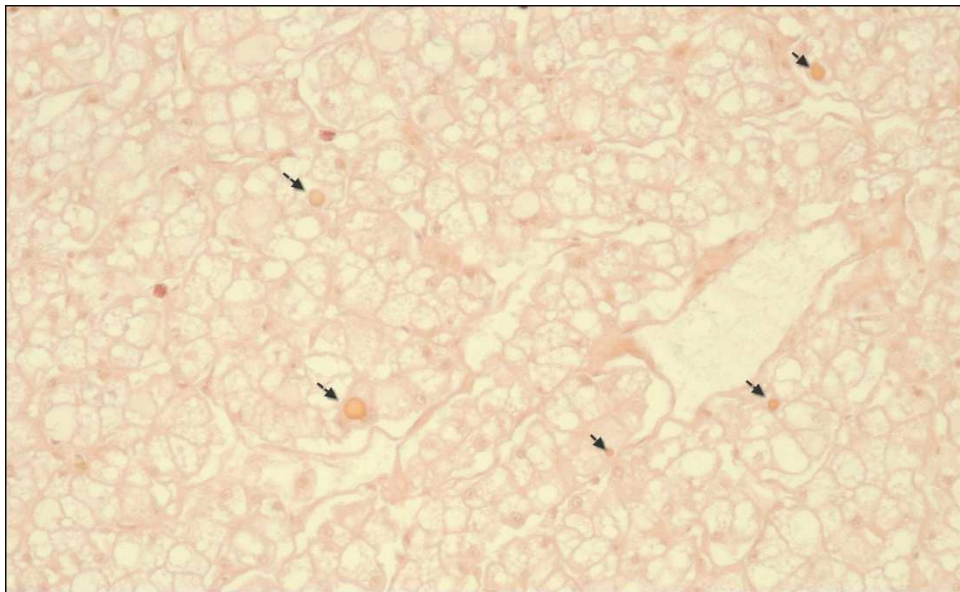


Figura N° 8. Las flechas muestran inclusiones intracitoplasmáticas de diferente tamaño, además de una severa lipidosis (hígado 40x).

Dentro del examen histológico del pulmón, se observaron inclusiones intracitoplasmáticas predominantemente en epitelio bronquial, y en menor frecuencia, en los alveolos. Otro hallazgo fue una severa neumonía en uno de los casos (*Python spp.*), en el que se observó un severo proceso inflamatorio tipo fibrino-purulento en el lumen alveolar y en la superficie bronquial, presentando infiltrado a base de heterófilos y células mononucleares. En este órgano no se encontraron inclusiones intracitoplasmáticas conjuntamente con el proceso inflamatorio. Además se encontró un engrosamiento del intersticio. Ver figura N° 9.





Figura N° 9. Inclusiones intracitoplasmáticas en epitelio bronquial. La flecha muestra la única inclusión en el campo (pulmones 40x).

Al examen del tejido nervioso, se encontraron inclusiones intracitoplasmáticas en las neuronas del cerebro, en gran número, además en cierto grado gliosis, con degeneración neuronal. Ver figura N° 10.

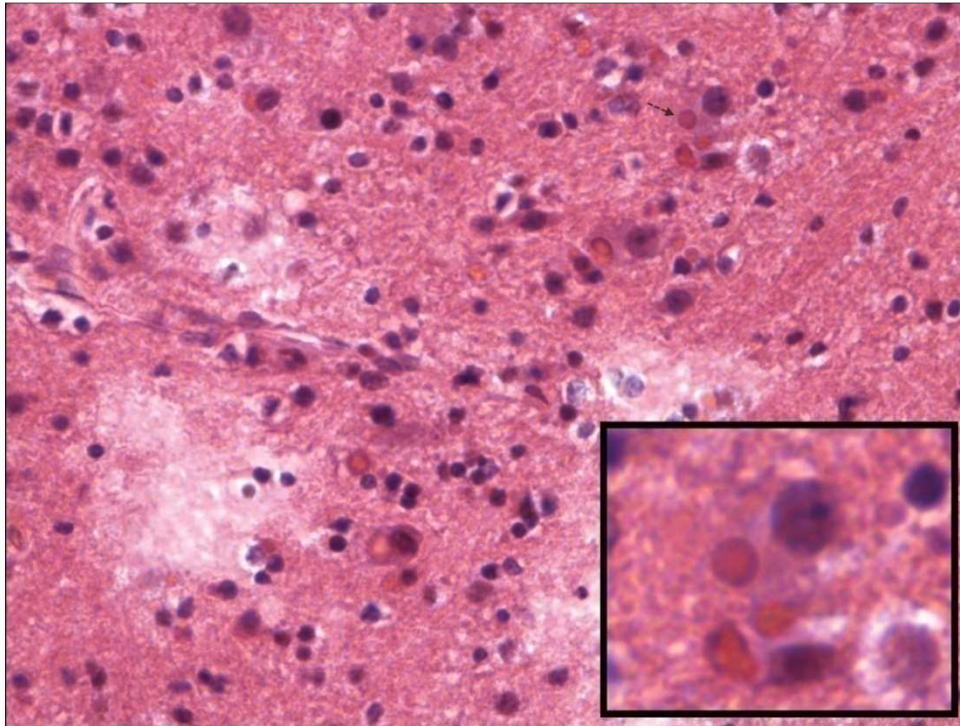


Figura N° 10. Inclusiones intracitoplasmáticas en tejido nervioso. Ampliado se observa una inclusión en una neurona (cerebro 60x).

En el tracto digestivo se encontraron inclusiones en las células epiteliales de la mucosa intestinal en mayor número que en la mucosa gástrica. Otro hallazgo encontrado fue la parasitosis intestinal (nematodos, coccidios y protozoarios no identificados).

La tiroides presentó inclusiones intracitoplasmáticas en las células foliculares (ver figura N° 11). En el ojo las inclusiones se encuentran en las células de la retina (ver figura N° 12). Por otro lado, en el testículo las inclusiones se hallaron en los túbulos seminíferos (ver figura N° 13). En estos órganos no se presentó ningún otro hallazgo relevante.

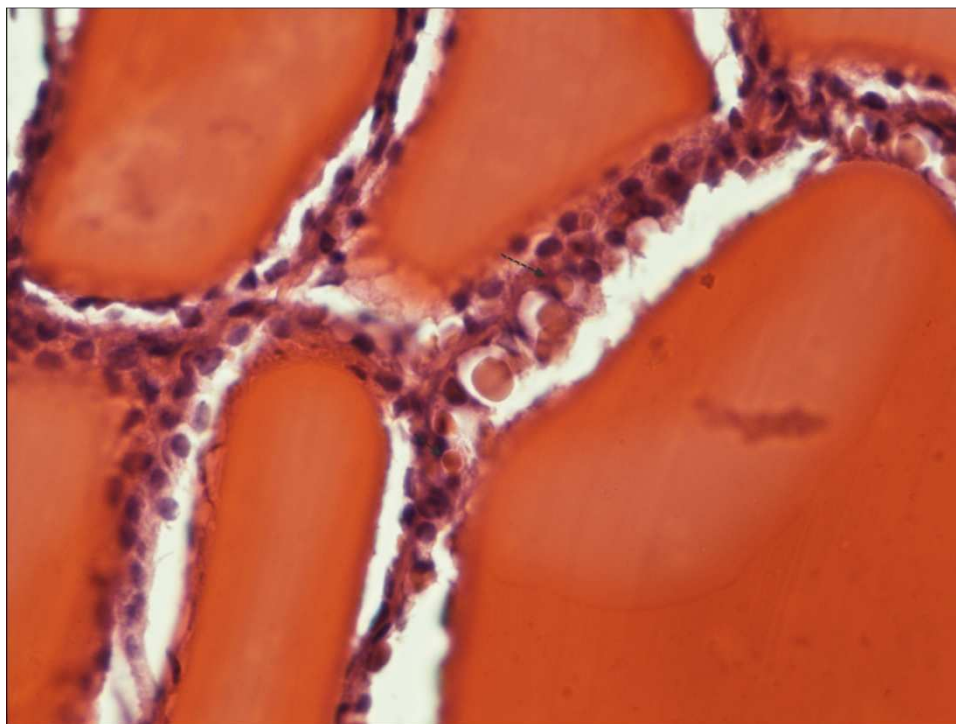


Figura N° 11. Inclusiones intracitoplasmáticas en células foliculares (tiroides 60x).

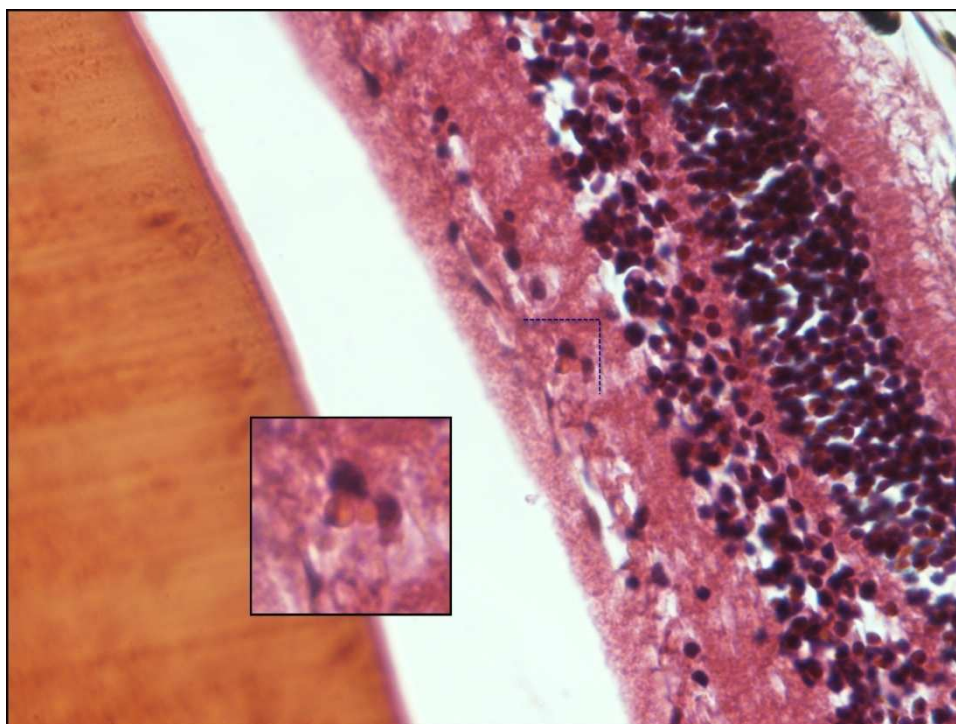


Figura N°12. Inclusiones intracitoplasmáticas en células de la retina. Ampliado para mostrar detalles de la inclusión (ojo 40x).

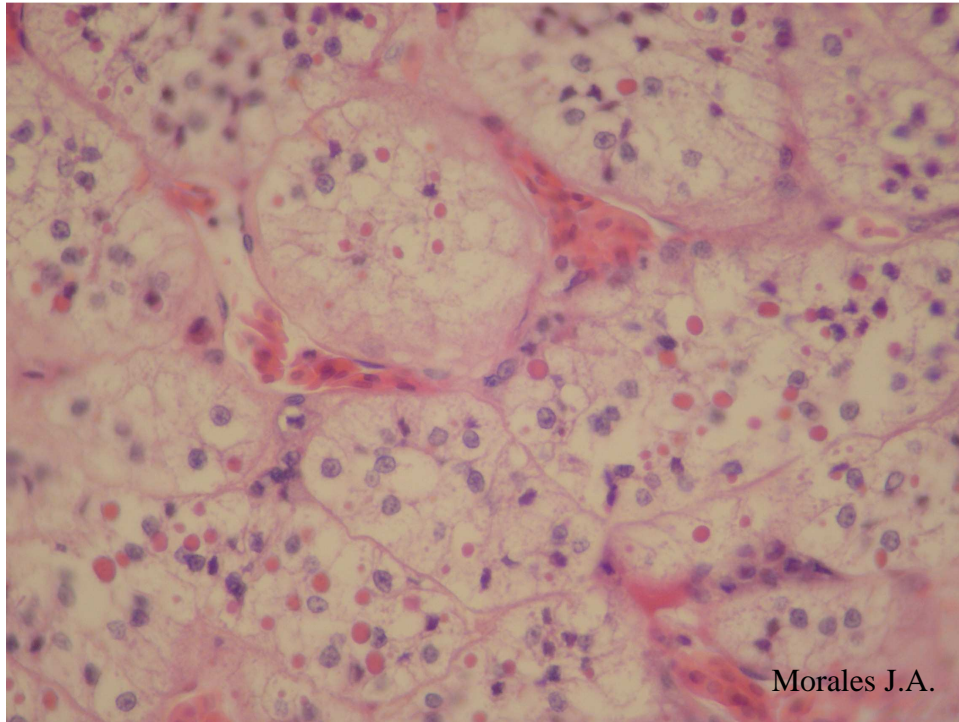


Figura N° 13. Inclusiones intracitoplasmáticas en los túbulos seminíferos (testículo 60x).

#### 4. DISCUSIÓN

Las especies evaluadas en este estudio, fueron individuos pertenecientes al grupo taxonómico de la familia boidae, debido a que esta es la única familia que ha sido diagnosticada con BIBD (Mader, 2006). De los 12 especímenes positivos a inclusiones intracelulares, hay miembros de varias subfamilias de este grupo de serpientes, lo que indica que, efectivamente todas estas subfamilias evaluadas, son susceptibles a sufrir la enfermedad de cuerpos de inclusión, especialmente aquellas especies clasificadas como nativas del nuevo mundo y presentes en Costa Rica. La mayoría de casos de BIBD son reportados de países en donde existen especies de boidos nativos y susceptibles.

La especie *Boa constrictor* es aparentemente una de las más susceptibles a la enfermedad, y además de estas, las *Corallus annulatus* parecen tener una alta prevalencia para esta enfermedad.

La Pitón burmesa (*Python morulus*) fue diagnosticada con BIBD, lo cual coincide con otros estudios donde se establece que las *Python spp.* representan uno de los grupos más afectados en poblaciones de serpientes en cautiverio mundialmente (Mader, 2006). Junto con esta, las *Boa constrictor*, son las especies de serpientes más populares como mascotas. Además, el hecho de ser animales reproducidos en cautiverio, lo que podría estar facilitando la diseminación de esta enfermedad a nivel mundial (Mader, 2006).

En este estudio, la especie más abundante analizada fue la *Boa constrictor* con un total de 26 individuos. Al haber un número tan grande en comparación con las otras especies, podría haberse generado un sesgo con respecto a los análisis con los demás grupos en este estudio. Por consiguiente la población en estudio es predominantemente *Boa constrictor*, de edad adulta y de sexo macho.

Por otro lado, los animales positivos en este estudio fueron exclusivamente individuos en cautiverio, todos los individuos de vida libre analizados fueron negativos a BIBD. Lo que confirma lo establecido por otros autores donde se reporta esta enfermedad en animales bajo condiciones de cautiverio (Vancraeynest et al., 2006; Hetzel et al., s.f.).

La alta prevalencia encontrada en este estudio (37.5%), coincide con el reporte de Garner & Raymond (2004), en donde se indica una prevalencia en boidos examinados postmortem en Northwest Zoopath, Estados Unidos, en subespecies de *Boa constrictor* (menor al 33%) y en la boa arborícola, *Corrallus annulatus* (28 %). La prevalencia reportada para las *Boa constrictor* en ese estudio de Garner & Raymond (2004), es muy similar a los resultados obtenidos, donde se encontró una prevalencia de 34.6% (9/26) para esta especie.

A pesar de esto, se dice que la prevalencia mundial de la enfermedad es desconocida (Garner & Raymond, 2004).

Los resultados negativos en el caso de las *Python curtus* analizadas, están en contraposición a lo establecido por otros autores, donde se ha observado que todas estas especies pueden ser susceptibles a la enfermedad (Hetzel et al., s.f.). Esto se puede explicar por un número reducido de animales analizados de esta especie, y además, no se cuenta con información real de la población presente en Costa Rica.

El hallazgo microscópico más frecuente que fue observado junto a las inclusiones intracelulares de la enfermedad, fue la degeneración lipídica del hígado con relativa frecuencia, la cual, está asociada con un desorden metabólico (Mader, 2006). Esta disfunción bioquímica puede estar asociada a la inanición y regurgitación que son producidas por esta enfermedad (Mader, 2006; Vancraeynest et al., 2006), esto podría

explicar la alta incidencia de esta patología en los individuos estudiados. Además esta enfermedad es una de las más comunes en cautiverio, causada por la sobre o sub alimentación, y la falta de ejercicio, por lo que, podría deberse además a otras causas fuera de la enfermedad en estudio (Mader, 2006).

La precipitación de uratos (gota, en su forma visceral) también se encontró junto con las inclusiones, ésta es el resultado de fallo renal entre otras causas (Raymond et al., 2001), el acúmulo de ácido úrico se debe a la falta de filtración por los túbulos del riñón, por ende, precipita en diversas partes del cuerpo (Mader, 2006). Sin embargo, faltarían más estudios para saber si este fallo renal es producido por las inclusiones o si fue una enfermedad concomitante junto al BIBD. La parasitosis hepática y del tracto digestivo, están asociadas más comúnmente con malas prácticas de manejo, pero también, podrían estar asociadas con una baja en la respuesta inmune que produce esta enfermedad, por lo que puede producir una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias (Wozniak et al., 2000; Vancraeynest et al., 2006, Hetzel et al., s.f). Además de estos hallazgos, se ha reportado hepatitis periportal, vacuolización y degeneración de hepatocitos y células pancreáticas, y necrosis de los túbulos renales, los cuales, no se evidenciaron en el presente trabajo (Vancraeynest et al., 2006).

Dentro de lo reportado para la enfermedad, se menciona que las boas pueden ser portadores asintomáticos, por lo que se puede asumir que este era el caso de algunas de las 5 serpientes que no presentaron ningún síntoma (Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006). En el estudio de Wozniak et al., (2000) confirman este hecho, ellos determinaron que luego un año de la inoculación de BIBD en boas sanas, ninguna presentaba síntomas de BIBD, lo que sugiere que las *Boa constrictor* presentan mayor resistencia que los otros miembros de la familia a la enfermedad, o que las boas, por otro lado, son hospederos

naturales a ciertas cepas del virus de BIBD como lo sugieren los mismos autores. Siendo el periodo de incubación de esta enfermedad desconocido, podríamos pensar que algunos de estos animales solo estaban en una fase de inicio de la enfermedad en el momento de llevarse a cabo la necropsia, con lo cual, la presentación de sintomatología asociada a esta enfermedad no fue evidente (Wozniak et al., 2000). Además, la falta de observación de los dueños, o la falta de experiencia a la hora de diferenciar ciertos signos como anormales, pudieron haber afectado en que la anamnesis de estos casos se presentara sin signos clínicos aparentes.

Otros 3 casos presentaron síntomas nerviosos, se reporta que se presentan en un animal con más tiempo de haber estado en contacto con el agente causal (Vancraeynest et al., 2006; Knotek et al., 2007). Al no conocer el momento en el cual el animal entró en contacto con el agente causal de la enfermedad, no se puede afirmar que este sea el caso.

Los síntomas gastrointestinales que fueron descritos en los resultados son el regurgito, la anorexia y la estomatitis, este primero reportado como el primer síntoma que se encuentra en animales con BIBD, seguido de la anorexia (Raymond et al., 2001; Vancraeynest et al., 2006; Knotek et al., 2007). En el presente trabajo se observó que las dos *Corallus annulatus* presentaban sintomatología gastrointestinal, y una de ellas desarrolló un cuadro nervioso posterior.

Los síntomas dermatológicos también han sido reportados, aunque en menor número, se han encontrado boidos con disecdisis o muda anormal, lo cual, concuerda con un caso de los estudiados (Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.).

En el caso que presentó síntomas respiratorios, cabe resaltar que es una *Python morulus*, y es reportado que existen diferencias en los signos clínicos y la progresión de la



enfermedad entre las subfamilias boinae y pythoninae, en las cuales esta enfermedad es mucho más aguda y con síntomas más graves (Vancraeynest et al., 2006). Este animal presentaba secreciones nasales, disnea y estertores húmedos, por lo que, se le diagnosticó bronco-neumonía junto con BIBD. Al haber una cantidad reducida de individuos, no podemos afirmar que se hayan dado diferencias entre estas dos subfamilias en nuestros casos.

En general todos los signos clínicos indican enfermedades concomitantes con BIBD, esto sugiere que es una enfermedad debilitante, la cual, produce una severa inmunosupresión, por lo que puede producir una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias (Wozniak et al., 2000; Vancraeynest et al., 2006, Hetzel et al., s.f).

La diferencia de variables en los sujetos positivos no indica que la especie sea una variable importante, esto pudo ocurrir debido a un sesgo de selección, pues la mayoría de especies son *B. constrictor*. Además no existe documentación que indique qué especie de Boido puede estar predispuesta a esta condición, a pesar que haber sido la especie más reportada en comparación con pitones y vipéridos (Garner & Raymond, 2004).

Acorde con Hetzel et al. (s.f.), no existe una diferencia significativa entre los porcentajes de individuos positivos y animales clasificados como juveniles y adultos. En el presente estudio se observó que el 80 % (IC: 44.9-100%) de los animales juveniles presentan BIBD, pero el intervalo de confianza fue muy amplio, esto no nos da certeza de que los resultados obtenidos son realmente validos en relación a esta variable. De los individuos clasificados como adultos, un 36.4% (IC: 16.3-56.5%) presentaron BIBD, por lo que tampoco se puede asociar en estos que la edad fuera una factor de susceptibilidad para la enfermedad.

Cuatro de las cinco *Boa constrictor* juveniles presentaron BIBD, es una cantidad grande de individuos, lo que nos puede sugerir que en estas boas pudo haber ocurrido una transmisión transovárica, ya que tres individuos analizados y positivos a BIBD fueron hermanos. Las posibles rutas de transmisión vertical sugeridas para esta enfermedad son transováricas (ovíparas), transplacentaria (vivíparas) y venérea (Raymond et al., 2001; Hetzel et al., s.f.).

El sexo indeterminado de 12 individuos se debió a que solo se analizó biopsias de hígado, y otras, no se determinó con certeza el sexo por dificultades técnicas (autólisis). Para la variable de sexo, no se pudo determinar si existe una diferencia significativa entre los individuos positivos y la variable en cuestión. Nuevamente, esto como resultado a un número de muestra muy bajo. A pesar de los resultados obtenidos, se ha reportado que no existe una diferencia entre el sexo del individuo y la susceptibilidad a la infección (Hetzel et al., s.f.).

Todos los órganos en individuos afectados por la BIBD pueden ser utilizados para la detección del agente causal, sin embargo, se ha reportado en aquellos tejidos de origen epitelial como los más probables para encontrar las inclusiones intracelulares, al igual que las células nerviosas (Raymond et al, 2001; Vancraeynest et al, 2006). Hetzel et al. (s.f.), afirma que las inclusiones se pueden encontrar en muchos o en todos los tipos de células, ya sean estas de origen mesenquimal o epitelial.

Las inclusiones pueden variar en cuanto a número y localización en las serpientes afectadas. En algunas de las serpientes analizadas, se pudo observar pocas inclusiones en un solo órgano, en cambio en otras se pudo observar numerosas inclusiones en diferentes células epiteliales y en diferentes órganos (Jacobson et al., 2001). Esto podría explicarse

debido a que, el número y cantidad de inclusiones varía con la progresión de la enfermedad (Wozniak et al., 2000).

En los resultados obtenidos se pone en evidencia que los mejores órganos para llevar a cabo una toma de muestra son: el cerebro, hígado, riñones, páncreas, bazo y testículo, pues en ellos se observó una alta densidad de inclusiones intracelulares (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynestet al., 2006; Knotek et al., 2007). Por lo que en animales vivos, se debería utilizar la biopsia de hígado, como órgano ideal, para llevar a cabo un diagnóstico antemortem de la enfermedad.

Contrario a lo reportado por otros autores, los resultados sugieren que la mucosa gástrica es un órgano con pocas probabilidades de observar las inclusiones, por lo tanto fue clasificado como regular para encontrar inclusiones, al igual que intestino y pulmón, siendo estos la segunda opción de órganos a muestrear en casos postmortem (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynestet al., 2006; Knotek et al., 2007). Si se está ante un animal vivo, la mucosa gástrica se podría utilizar para un diagnóstico antemortem, por medio de la endoscopia (Garner & Raymond, 2004; Vancraeynest et al., 2006), sin embargo, se debe tener en consideración que la biopsia de la mucosa estomacal puede ofrecer falsos negativos por su baja posibilidad de detección de inclusiones.

El corazón presentó una muy baja densidad de inclusiones, siendo vistas en un solo individuo de los 8 muestreados. A pesar que estas son posibles de encontrar (Knotek et al., 2007; Hetzel et al., s.f.), la baja densidad de inclusiones y de individuos que lo presentan hace más difícil el diagnóstico solo basándose en este corte histológico.

Además, se encontraron inclusiones en ojo y en tiroides, que no son órganos muy utilizados para el diagnóstico de BIBD, pero si han sido reportados por Raymond et al. (2001) y Hetzel et al. (S.f.).

Observando la distribución de las inclusiones dentro de los tejidos, se encontró que estas presentaban afinidad por las células de origen epitelial, y que, las células acinares, glandulares y de tejido nervioso presentaron una enorme densidad de inclusiones en comparación con otros tejidos observados.

## 5. CONCLUSIONES

Se puede afirmar que la enfermedad conocida como BIBD está presente en Costa Rica, en al menos en poblaciones de serpientes nativas y exóticas bajo condiciones de cautiverio.

La presencia de inclusiones intracelulares en serpientes de la familia de los boidos presentes en Costa Rica, se debe considerar como un hallazgo diagnóstico ante la enfermedad de BIBD.

No se pudo establecer en este estudio una relación significativa en cuanto a las variables de especie, edad y sexo.

Las inclusiones se pueden encontrar en cualquier órgano del individuo, pero es recomendable ante un diagnóstico antemortem usar especialmente el hígado y la mucosa gástrica como órganos a muestrear, y para el diagnóstico postmortem cerebro, hígado, riñones, páncreas, bazo y testículo son los órganos de elección.

Las inclusiones presentan afinidad por células epiteliales de diferentes órganos.

Cualquier serpiente sana en contacto con las serpientes infectadas es susceptible a sufrir la enfermedad de BIBD.

No se sabe si la enfermedad fue importada con algún ejemplar o si es endémica.

## 6. RECOMENDACIONES

Se debe realizar un trabajo, el cual, estudie la ocurrencia de la enfermedad en poblaciones silvestres, ya que, al ser una enfermedad mortal podría reducir las mismas.

Se debe hacer periodo de cuarentena de 6 a 12 meses a cada boa adquirida, y de ser posible realizar biopsia de hígado para descartar BIBD.

Mantener las colecciones en buen estado de higiene, evitando acarrear patógenos por utensilios, comidas, objetos o manos, de un terrario al otro. Además, mantener la colección de serpientes libre de ectoparásitos, principalmente de *Ophionyssus natricis*, ya que, este parásito puede actuar como vector de la enfermedad, a pesar de que este hecho no se ha comprobado (Raymond et al, 2001; Vancraeynest et al, 2006; Knotek et al, 2007).

A cualquier boido con sintomatología compatible se le deberá realizar una biopsia hepática o por endoscopia de la mucosa gástrica. En caso de muerte se le deberá realizar un estudio posmortem, El cadáver debe ser almacenado en frío y transportarse lo antes posible al Servicio de Patología para su estudio.

Los síntomas de esta enfermedad pueden ser confundidos con otras de origen infeccioso, ya que son síntomas muy inespecíficos. Se deben considerar otros diagnósticos diferenciales.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azpiri, G., F. Galindo Maldonado & G. Ceballos González. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Vet. Mex.* 31: 223–230.
- Bartlett, R.D. & P. Bartlett. 1997. *Lizard care from A to Z*. 1<sup>st</sup> ed. Barron Educational Series, EEUU.
- Bennett, R .A. 1996. Neurology. p 141-148. *In* reptile medicine and surgery. D. R. Mader. (ed) W. B. Saunders, Philadelphia.
- Carlisle-Nowak, M.S., N. Sullivan, M. Carrigan, C. Knight, C. Ryan & E.R. Jacobson. 1998. Inclusion body disease in two captive Australian pythons (*Morelia spilota variegata* and *Morelia spilota spilota*) *Australian Veterinary Journal* 76, 98-100
- Chandra, A. M. S., E. R. Jacobson & R. J. Munn. 2001. Retroviral particles in neoplasms of Burmese pythons (*Python molurus bivittatus*). *Vet. Pathol.* 38, 561-564
- Fleming, G. J., D.J. Heard, E.R. Jacobson & C. Buergelt. 2003. Cytoplasmic inclusions in Corn snakes, *Elaphe guttata*, resembling inclusion body disease of Boid snakes. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 13, 18-22
- Fowler, M. & R.E. Miller. 1999. *Zoo and wild animal medicine: current therapy* 4. 4<sup>th</sup>. ed. W.B. Saunders, EE.UU.
- Franke, J. & T.M. Telecky. 2001. Reptiles as pets, an examination of the trade in live reptiles in the United States. The Humane Society of the United States, EEUU.
- Frye, F.I. 1993. *A practical guide for feeding captive reptiles*. original ed. Krieger Publishing Company. EEUU.
- Garner, M. M. & J. T. Raymond. 2004 . Methods for diagnosing inclusion body disease in snakes. p 21-25 *In* Proceedings of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarians Congress May 8-11. Naples, USA.
- Hernandez, J. 1999. La legislación, la cría y la conservación de la fauna silvestre de Costa Rica. [en línea] . p.515-516. *In* XI Congreso Nacional Agronómico. Jul 19-23. MAG. Costa Rica. [www.mag.go.cr/congreso\\_agronomico\\_XI/a50-6907-III\\_515.pdf](http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-III_515.pdf) (Consulta: 05 jul. 2009)
- Hetzel, U. 2008. Entrevista con el señor Udo Hetzel. Department of Pathology, Liverpool University. Heredia, C.R. oct. 06.
- Hetzel, U., J. Williams, F. Buser, A. Hopkins & J.A. Morales. Inclusion body disease (IBD) in captive garden tree boa, *Corallus hortunalus*. En prensa.

- Huder, J.B., J. Boni & J.M. Hatt. 2002. Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous retroviruses in pythons (*Python molurus* and *Python curtus*) J. Virol. 76: 7607-7615
- Jacobson, E.R. 2006. Infectious diseases and pathology of reptiles. Taylor & Francis, EEUU.
- Jacobson, E.R. 1978. Reptile necropsy protocol. J. Zoo Anim. Med. 9: 7-13
- Jacobson, E.R., J. Oros & S.J. Tucker. 2001. Partial characterisation of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. Am. J. Vet. Res. 62:217-224
- Knotek, Z., V. Jekl & G.M. Dorrestein. 2007. Presumptive viral infections in captive populations of boa constrictor in the Czech Republic. Vet. Med. 52: 512-520
- Mader, D.R. 2006. Reptile medicine and surgery. 2<sup>nd</sup> ed. Saunders, EEUU.
- Morales, J.A. 2008. Entrevista con el Dr. Juan Alberto Morales. Departamento de Patología, Universidad Nacional. Heredia, C. R. Set. 04
- Oros, J., S. Tucker & E. R. Jacobson. 1998. Inclusion body disease in two captive boas in the Canary Islands. Vet. Rec. 143, 283-285
- Orti, R.M., P. Marin & J. Gonzalez. 2004. Atlas de Anatomía de Animales Exóticos. 1ra ed. Masson El Sevier. Barcelona.
- Raymond, J.T., M.M. Gamer & R.W. Nordhausen. 2001. A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Bothriechis marchi*). J. Vet. Diagn. Invest. 13:82-86
- Roberts, R.J. & D.A. Smail. 2001. Laboratory methods. p. 380 – 386. In R. Roberts, (ed.). Fish Pathology. W. B. Saunders, London, U.K.
- 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
- Schumacher, J., E. R. Jacobson, B. L. Homer, & J.M. Gaskin. 1994. Inclusion body disease in boid snakes. J. Zoo and Wildl. Med. 25, 511-524
- Solórzano, A. 2004. Serpientes de Costa Rica, Distribucion, taxonomia e historia natural. 1ra ed. Editorial INBio, C. R.
- Vancraeynest, D., F. Pasmans & A. Martel. 2006. Inclusion body disease in snakes: a review and description of three cases in boa constrictors in Belgium. Vet. Rec. 158: 757-761
- Waine, D. 2006. Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. Editorial Limusa, Méx.



- WCS (Wildlife Conservation Society). 2008. Introducción: Por qué realizar necropsias de animales silvestres? [en línea]. WCS, EEUU. [http://www.wcs.org/sw-gh\\_tech\\_tools/wildlifehealthscience/fvp/168570/guidelines](http://www.wcs.org/sw-gh_tech_tools/wildlifehealthscience/fvp/168570/guidelines) andpapers/Necropsymanualspanish/169377 (Consulta 03 de Julio 2009).
- Wozniak, E., J. McBride & D. Denardo. 2000. Isolation and characterization of an antigenically distinct 68- kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (BIBDV: Retroviridae). *Vet. Pathol.* 37:449–459
- Zeigel, R. F. & H. F. Clark. 1969 .Electron microscopic observations on a 'C'-type virus in cell cultures derived from a tumor-bearing viper. *J. Nat. Cancer. Inst.* 43, 1097-1102
- Zug, G.R., L.J. Vitt & J.P. Caldwell. 2001. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 2da ed. Academic Press. EEUU
- Zwart, P., U. Hetzel & K. J. Dik. 2001. Osteitis deformans and concomitant inclusion body disease in a boa (*Boa constrictor*). *Verhandlungsbericht Erkrankungen der Zootiere* 40, 61-66

