



## Morphological characterization of fluke eggs in green turtles (*Chelonia mydas*) found on the coast of Espírito Santo State, Brazil

### Caracterización morfológica de huevos de trematodos de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) encontrados en la costa del estado de Espírito Santo, Brasil

[Moara Cuzzuol Gomes](#)<sup>1</sup>, [André Garcia Oliveira](#)<sup>1</sup>, [Gabriel Domingos Carvalho](#)<sup>2</sup>, [Isabella Vilhena Freire Martins](#)<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Espírito Santo, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

<sup>2</sup> Federal Institute of Espírito Santo, Ifes Campus Piúma, 29285-000, Piúma, Espírito Santo, Brazil.

<sup>3</sup> Federal University of Espírito Santo, Department of Veterinary Medicine, 16, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

\* Corresponding author. E-mail: [ivfmartins@gmail.com](mailto:ivfmartins@gmail.com)

**ABSTRACT.** Although some studies have identified parasites in green turtles (*Chelonia mydas*), little is known about the morphology of helminth eggs in the feces of these animals. The aim of this study was to morphologically characterize helminth eggs recovered in copro-parasitological exams by sedimentation and to analyze their relationship with helminth species recovered during necropsy of juvenile specimens of *C. mydas*. Four different egg morphotypes were found, identified, and classified as digenetic trematodes of the families Microscaphidiidae, Cladorchiidae, and Spirorchiidae. There was morphological diversity in the size of the eggs measured directly in adult parasites, with sizes ranging from 19.07 to 99.28  $\mu\text{m}$  in length and from 11.35 to 45.66  $\mu\text{m}$  in width. The observation of eggs on coproparasitological exams is important for studying the ecology of sea turtle parasites, since the life cycle of some species is not yet fully understood.

**Key words:** digenetic trematodes, green turtle, marine turtles.

**RESUMEN.** Aunque algunos estudios han identificado parásitos en tortugas verdes (*Chelonia mydas*), poco se sabe sobre la morfología de los huevos de helmintos en las heces de estos animales. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológicamente huevos de helmintos recuperados en exámenes coproparasitológicos por sedimentación y analizar su relación con especies de helmintos recuperados durante la necropsia de ejemplares juveniles de *C. mydas*. Se encontraron e identificaron 4 morfotipos de huevos distintos, clasificados como trematodos digenéticos de las familias Microscaphidiidae, Cladorchiidae y Spirorchiidae. Hubo diversidad morfológica en el tamaño de los huevos medidos directamente en los parásitos adultos, con tamaños que variaron de 19.07 a 99.28  $\mu\text{m}$  de largo y 11.35 a 45.66  $\mu\text{m}$  de ancho. La observación de huevos en exámenes coproparasitológicos es importante para el estudio de la ecología de los parásitos de las tortugas marinas, ya que el ciclo de vida de algunas especies aún no es completamente entendido.

**Palabras clave:** trematodos digenéticos, tortugas marinas, tortuga verde.



## INTRODUCTION

The green turtle (*Chelonia mydas*) is distributed worldwide and has a very abundant and diversified parasitic fauna (Santoro et al. 2006, Greiner 2013). In Brazil, studies on the parasitic fauna of *C. mydas* revealed a considerable occurrence of helminths of the class Digenea (Werneck and Silva 2015, Binoti et al. 2016, Gomes et al. 2017). Between 2004 and 2011, Werneck and Silva (2015) analyzed the helminth composition in juvenile green turtles for the first time in Brazil, and Binoti et al. (2016) and Gomes et al. (2017) characterized these helminths and the ecological aspects of the gastrointestinal helminth community in juveniles of *C. mydas*.

Diagnosis of helminthiasis in sea turtles is usually made during necropsy through the collection and study of adult parasites (Greiner and Mader 2006, Chapman et al. 2019); it is not common to perform coproparasitological exams, although they are possible and justified to use as a noninvasive method (Greiner and Mader 2006). Marangi et al. (2020) conducted the first multicenter coprological survey of free-living sea turtle (*Caretta caretta*) helminth communities, considering that the main method for diagnosing endoparasites in these animals is through fecal examination for egg detection.

The identification of eggs is based on their morphology and morphometry, with consideration of the structures developing within the egg, egg shape, length, width of thorns or filaments in the poles, number of filaments, and filament length. However, some eggs observed in fecal samples are not identifiable to species or genera. In some cases, the dynamics of egg elimination in feces have been little explored. Furthermore, it is unclear how the digenea adults found in places outside the digestive system eliminate their eggs in the host feces. For the spirorchiid life cycle, 3 main possible shedding pathways have been hypothesized, including through feces, expectoration, and postmortem decomposition or scavenging of a carcass with egg dispersion (Chapman et al. 2019). Santoro et al. (2020) obtained an enormous quantity of eggs containing live miracidium from carcasses of sea turtles positive for spirorchiid infection, which suggests that viable eggs might be shed through the feces or dispersed after postmortem decomposition.

Due to the lack of articles on the morphology and morphometry of eggs in turtle helminths, the aim of this study was to morphologically and morphometrically characterize helminth eggs recovered in sedimentation coproparasitological exams and to analyze their relationship with helminth species recovered during necropsy of juvenile specimens of green turtles (*C. mydas*).

## MATERIALS AND METHODS

Thirty-six juvenile specimens of green turtle (*C. mydas*, Linnaeus 1758) (Testudines, Cheloniidae) found dead on the

## INTRODUCCIÓN

La tortuga verde (*Chelonia mydas*) se distribuye a nivel mundial y tiene una fauna parasitaria muy abundante y diversificada (Santoro et al. 2006, Greiner 2013). En Brasil, los estudios sobre la fauna parasitaria de *C. mydas* revelaron la presencia considerable de helmintos de la clase Digenea (Werneck y Silva 2015, Binoti et al. 2016, Gomes et al. 2017). Entre 2004 y 2011, Werneck y Silva (2015) analizaron la composición de helmintos en tortugas verdes juveniles por primera vez en Brasil, y Binoti et al. (2016) y Gomes et al. (2017) caracterizaron estos helmintos y los aspectos ecológicos de la comunidad de helmintos gastrointestinales en juveniles de *C. mydas*.

El diagnóstico de helmintiasis en tortugas marinas generalmente se realiza durante la necropsia a través de la recolección y el estudio de parásitos adultos (Greiner y Mader 2006, Chapman et al. 2019); no es común realizar exámenes coproparasitológicos, aunque es posible y justificado su uso como método no invasivo (Greiner y Mader 2006). Considerando que el principal método para diagnosticar endoparásitos en estos animales es a través del examen fecal para la detección de huevos, Marangi et al. (2020) realizaron el primer estudio coprológico multicéntrico de comunidades de helmintos de tortugas marinas (*Caretta caretta*) de vida libre.

La identificación de los huevos se basa en su morfología y morfometría, y se consideran las estructuras que se desarrollan dentro del huevo, la forma del huevo, la longitud, el ancho de las espinas o filamentos en los polos, el número de filamentos y la longitud del filamento. Sin embargo, algunos huevos observados en muestras fecales no se pueden identificar a nivel de especie o género. En algunos casos, la dinámica de la eliminación de huevos en las heces ha sido poco explorada. Además, no está claro cómo los adultos de Digenea que se encuentran en lugares fuera del sistema digestivo eliminan sus huevos en las heces del huésped. Para el ciclo de vida de los espirorquidos, se hipotetizaron 3 posibles vías principales de eliminación, que incluyen las heces, la expectoración y la descomposición *post mortem* o la actividad de carroñeros sobre los cadáveres con dispersión de huevos (Chapman et al. 2019). Santoro et al. (2020) obtuvieron una enorme cantidad de huevos que contenían miracidio vivo de cadáveres de tortugas marinas que resultaron positivas para la infección por espirorquidos, lo que sugiere que los huevos viables podrían eliminarse a través de las heces o dispersarse después de la descomposición *post mortem*.

Debido a la falta de artículos sobre la morfología y la morfometría de los huevos de helmintos en tortugas, el objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y morfométricamente huevos de helmintos recuperados en exámenes coproparasitológicos de sedimentación y analizar su relación con especies de helmintos recuperadas durante la necropsia de ejemplares juveniles de tortugas verdes (*C. mydas*).

southern coast of the state of Espírito Santo, Brazil, from March to August 2015 were necropsied, and the contents of the gastrointestinal tract were inspected for parasites. The animals were rescued by the Beach Monitoring Program of the Campos and Espírito Santo basins, in a stretch of approximately 200 km (from the southern to the middle of Espírito Santo coast), between the beaches of Nova Almeida/Serra (20°02'20" S, 40°10'50" W) and Marobá/Presidente Kennedy (21°11'45" S, 40°55'54" W).

The collected parasite specimens were fixed in acetic formaldehyde alcohol (AFA) for 24 h between 2 glass slides and then packed in plastic tubes containing 70% alcohol. The slide assembly was performed according to the laboratory protocol following the steps of clarification, staining, dehydration, and diaphanization. The identification of adult helminths was based on morphological evaluation according to Werneck (2007) and Fernandes and Kohn (2014), and the eggs were evaluated morphologically and morphometrically.

To perform the coproparasitological examination, stool samples were collected directly from the rectal ampoule during the necropsy. The feces were processed according to the sedimentation technique described by Foreyt (2005), and the observed eggs were collected and placed on slides, classified under an optical microscope according to morphology (Greiner 2013), and quantified according to morphotype. A comparison was made between eggs from coprological analyses and eggs observed in the collected adult flukes.

## RESULTS

Of the 36 necropsied turtles, it was not possible to collect samples from 2 of them because of absence of fecal content. Of the 34 coproparasitological exams performed, 31 gave positive results for the presence of helminth eggs. Four different types of eggs were found and classified according to their morphology (Fig. 1) and morphometry (Table 1).

Adult helminths were collected in 34 of the 36 turtles evaluated, and 18 species of trematodes belonging to 4 families were found (Table 2). Eggs measured directly inside the adult helminths fixed on lamina showed morphological diversity in relation to size, with lengths ranging from 19.07 to 99.28  $\mu\text{m}$  and widths ranging from 11.35 to 45.66  $\mu\text{m}$ , with an average length of  $45.52 \pm 28.23 \mu\text{m}$  and an average width of  $24.81 \pm 16.06 \mu\text{m}$ . This size variation in eggs measured inside adult parasites may be related to the maturation cycles of eggs before their oviposition. The egg measurements of each helminth species are specified in Table 1. One parasite species (*Learedius learedi*) did not present eggs inside the specimen, making morphometric analysis impossible.

## DISCUSSION

Although eggs are generally more abundant than adult worms, microscopic identification of eggs is difficult due to similarities in the morphology of eggs from congeners

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron necropsias de 36 ejemplares de juveniles de tortuga verde (*C. mydas*, Linnaeus 1758) (Testudines, Cheloniidae) encontrados muertos en la costa sur del estado de Espírito Santo, Brasil, de marzo a agosto de 2015, y se inspeccionó el contenido del tracto gastrointestinal en busca de parásitos. Los animales fueron rescatados por el Programa de Monitoreo de Playas de las cuencas de Campos y Espírito Santo, en un tramo de aproximadamente 200 km (desde el sur hasta el centro de la costa de Espírito Santo), entre las playas de Nova Almeida/Serra (20°02'20" S, 40°10'50" W) y Marobá/Presidente Kennedy (21°11'45" S, 40°55'54" W).

Los especímenes de parásitos recolectados se fijaron en alcohol de formaldehído acético (AFA) durante 24 h entre 2 portaobjetos de vidrio y luego se envasaron en tubos de plástico que contenían alcohol al 70%. El montaje de los portaobjetos se realizó de acuerdo con el protocolo de laboratorio siguiendo los pasos de clarificación, tinción, deshidratación y diafanización. Los helmintos adultos se identificaron por medio de la evaluación morfológica según Werneck (2007) y Fernandes y Kohn (2014), y se evaluó la morfología y morfometría de los huevos.

Para realizar el examen coproparasitológico, se recolectaron muestras de heces directamente de la ampolla rectal durante la necropsia. Las heces se procesaron según la técnica de sedimentación descrita por Foreyt (2005), y los huevos observados se recolectaron y colocaron en portaobjetos, se clasificaron al microscopio óptico según su morfología (Greiner 2013) y se cuantificaron según el morfotipo. Se hizo una comparación entre los huevos de los análisis coprológicos y los huevos observados en los trematodos adultos recolectados.

## RESULTADOS

De las 36 tortugas necropsiadas, no fue posible recolectar muestras de 2 de ellas por la ausencia de contenido fecal. De los 34 exámenes coproparasitológicos realizados, 31 dieron resultados positivos para la presencia de huevos de helmintos. Se encontraron 4 tipos diferentes de huevos, y se clasificaron según su morfología (Fig. 1) y morfometría (Tabla 1).

Se recolectaron helmintos adultos en 34 de las 36 tortugas evaluadas, y se encontraron 18 especies de trematodos pertenecientes a 4 familias (Tabla 2). Los huevos medidos directamente en el interior de los helmintos adultos fijados en lámina mostraron diversidad morfológica con relación al tamaño, con longitudes que oscilaron entre 19.07 y 99.28  $\mu\text{m}$  y anchuras que oscilaron entre 11.35 y 45.66  $\mu\text{m}$ , con una longitud media de  $45.52 \pm 28.23 \mu\text{m}$  y una anchura media de  $24.81 \pm 16.06 \mu\text{m}$ . Esta variación de tamaño en los huevos medidos dentro de los parásitos adultos puede estar relacionada con los ciclos de maduración de los huevos antes de su oviposición. Las medidas de

or even members of different genera given the frequency of mixed infections in the same individual (Chapman et al. 2017, Stacy et al. 2017). The eggs found in this study are morphologically similar to the few descriptions existing in the researched literature. In this study, the main limitation was comparing the relation of the egg morphometry observed in the adult helminths collected during necropsy and correlating with the presence of the eggs recovered in coproparasitological examinations. The adult helminths found in this work (Table 2) were previously described by Gomes et al. (2017) in the same region and were observed to have a major prevalence for *Cricocephalus albus*, *Metacetabulum invaginatum*, and *Neoctangium travassosi* (Gomes et al. 2017).

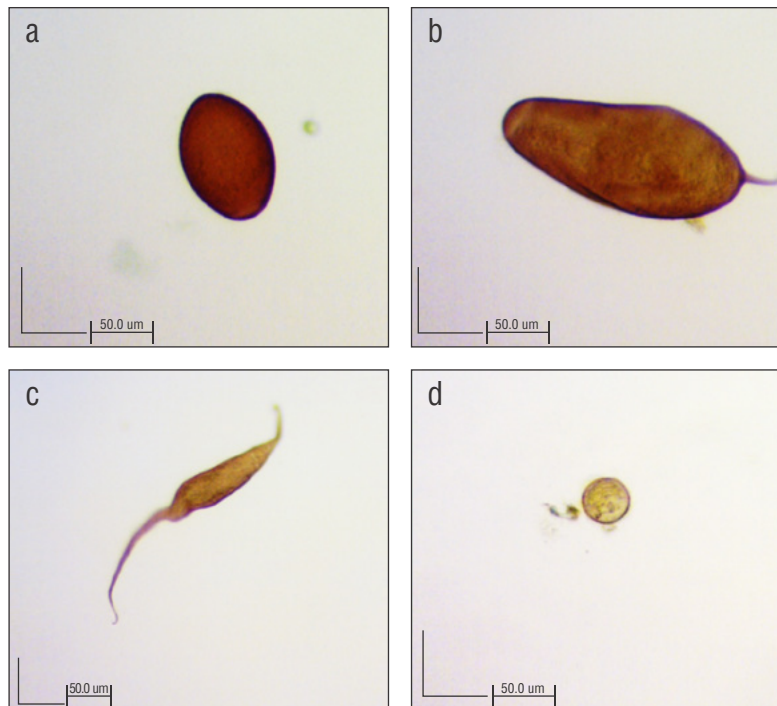
Greiner (2013) used a sedimentation technique as a diagnostic principle, similar to this study. The Foreyt (2005) technique was also used to describe egg measurements for the species *C. albus*, *Charaxicephalus robustus*, *Pronochephalus obliquus*, and *Schizamphistomum scleroporium*. Marangi et al. (2020) also performed coprological exams using morphological and morphometric characteristics to identify eggs, as reported by Greiner (2013).

This size variation in eggs measured inside adult parasites may be related to the maturation cycles of eggs before their oviposition. In relation to egg morphometry in adult helminths, Werneck (2007) obtained results similar

los huevos de cada especie de helminto se especifican en la Tabla 1. Una especie de parásito (*Learedius learedi*) no presentó huevos dentro del espécimen, lo que imposibilitó el análisis morfométrico.

## DISCUSIÓN

Aunque los huevos son generalmente más abundantes que los parásitos adultos, la identificación microscópica de los huevos es difícil debido a las similitudes en la morfología de los huevos de congéneres o incluso miembros de diferentes géneros dada la frecuencia de infecciones mixtas en el mismo individuo (Chapman et al. 2017, Stacy et al. 2017). Los huevos encontrados en este estudio son morfológicamente similares a las pocas descripciones existentes en la literatura investigada. En este estudio, la principal limitación fue comparar la relación de la morfometría de los huevos observada en los helmintos adultos recolectados durante la necropsia y correlacionarla con la presencia de los huevos recuperados en los exámenes coproparasitológicos. Anteriormente, Gomes et al. (2017) describieron a los helmintos adultos encontrados en este trabajo (Tabla 2) en la misma región y observaron una prevalencia importante de *Cricocephalus albus*, *Metacetabulum invaginatum* y *Neoctangium travassosi* (Gomes et al. 2017).



**Figure 1.** Photomicrograph of the types of eggs recovered by coproparasitological exams. (a) egg type 1, (b) egg type 2, (c) egg type 3, and (d) egg type 4.

**Figura 1.** Fotomicrografía de los tipos de huevos recuperados por exámenes coproparasitológicos. (a) huevo tipo 1, (b) huevo tipo 2, (c) huevo tipo 3 y (d) huevo tipo 4.

**Table 1.** Morphometrical and morphological characterization of eggs of gastrointestinal digeneans found on fecal samples of green turtles (*Chelonia mydas*) from the coast of Espírito Santo, Brazil.

**Tabla 1.** Caracterización morfológica y morfológica de huevos de digeneos gastrointestinales encontrados en muestras fecales de tortuga verde (*Chelonia mydas*) de la costa de Espírito Santo, Brasil.

Type of egg	Morphological characterization	Average egg length (µm)	Average egg width (µm)
1	Ovoid shape, presence of operculum in one extremity, yellow-brownish coloration.	98.16 ± 2.32	67.11 ± 2.34
2	Pyriform shape with short terminal process and hook form, presence of operculum at the end opposite the terminal process, yellow-brownish coloration.	174.39 ± 10.44	74.77 ± 6.30
3	Elongated shape with two terminal processes, one at each end and often curved; absence of operculum; yellow-brownish coloration.	340.02 ± 62.32	45.48 ± 12.72
4	Rounded shape, absence of operculum, brownish yellow coloration.	33.38 (diameter)	

**Table 2.** Morphometry of eggs of gastrointestinal digeneans found in green turtles (*Chelonia mydas*) from the coast of Espírito Santo, Brazil.

**Tabla 2.** Morfometría de huevos de digeneos gastrointestinales encontrados en tortugas verdes (*Chelonia mydas*) de la costa de Espírito Santo, Brasil.

Family	Species	Average egg length (µm)	Average egg width (µm)
Cladorchiidae	<i>Schizamphistomum scleroporium</i>	99.28	45.66
Microscophiidae	<i>Angiodictyum longum</i>	66.31	38.34
	<i>Angiodictyum parallelum</i>	64.89	40.83
	<i>Deuterobaris intestinalis</i>	90.83	45.34
	<i>Deuteribaris proteus</i>	80.96	45.85
	<i>Neotangium travassosi</i>	84.73	53.51
	<i>Polyangium linguatula</i>	67.10	43.26
	Pronocephalidae	<i>Charaxicephaloides polyorchis</i>	27.27
<i>Charaxicephalus robustus</i>		27.84	13.52
<i>Cricocephalus albus</i>		20.77	13.86
<i>Cricocephalus megastomum</i>		31.81	11.10
<i>Metacetabulum invaginatum</i>		24.15	12.88
<i>Pleurogonius linearis</i>		33.17	15.98
<i>Pleurogonius lobatos</i>		25.87	12.41
<i>Pleurogonius longiusculus</i>		24.67	12.29
<i>Pronocephalus obliquus</i>		20.45	13.00
<i>Pronocephalus trigonocephalus</i>	19.07	11.35	
Spirorchiidae	<i>Learedius learedi</i>	-	-

to those of the present study for the egg measurements of *C. albus*, *Cricocephalus megastomun*, *Deuterobaris proteus*, *M. invaginatum*, *N. travassosi*, *Pleurogonius longiusculus*, *Polyangium linguatula*, and *P. obliquus*. Santoro et al. (2007), when examining adult specimens of *Pleurogonius tortugueroi* isolated from *C. mydas*, observed eggs measuring on average 27.00  $\mu\text{m}$  in length by 14.00  $\mu\text{m}$  in width, values close to those found in this work for parasites of other species of the same genus: *Pleurogonius linearis* (33.17  $\times$  15.98  $\mu\text{m}$ ), *Pleurogonius lobatos* (25.87  $\times$  12.41  $\mu\text{m}$ ), and *P. longiusculus* (24.67  $\times$  12.29  $\mu\text{m}$ ).

In this study, helminths *Deuterobaris intestinalis*, *D. proteus*, *N. travassosi*, and *S. scleroporum* presented egg sizes close to each other and morphometrically similar to egg type 1. Greiner (2013) identified eggs similar to these, 98.00  $\times$  60.00  $\mu\text{m}$ , as *S. scleroporum* and *D. proteus*. This same author also reported eggs similar to types 2 and 3, belonging to helminths of the genera *Carettacola* (88.00  $\times$  38.00  $\mu\text{m}$ ) and *Hapalotrema* (414.00  $\times$  36.00  $\mu\text{m}$ ), respectively, belonging to the family Spirorchiidae. Work (2005) found eggs similar to types 2, 3, and 4 with measurements of 135.00  $\times$  67.00  $\mu\text{m}$ , 276.00  $\times$  37.00  $\mu\text{m}$ , and 45.00  $\times$  30.00  $\mu\text{m}$ , respectively, being identified as helminths belonging to the family Spirorchiidae.

Some studies that microscopically analyzed tissue samples (spleen, lungs, intestine, kidneys, and heart) (Santoro et al. 2007b) and fecal samples of *C. mydas* (Santoro et al. 2020) identified eggs similar to types 3 and 4 of this study as corresponding to eggs of spirochiid helminths (Digenea: Spirorchiidae) of the genera *Hapalotrema* and *Neosporichis*, respectively. Jerdy et al. (2019) also recorded the observation of spiral-shaped eggs with a circular appearance, similar to species of the genus *Neosporichis*, in ocular tissue of *C. mydas*. Finding helminth eggs of the family Spirorchiidae in the coproparasitological examination reveals important data for the study of the ecology of these parasites, since their life cycle is not yet well elucidated (Chapman et al. 2019).

Four different types of eggs were found and identified according to morphology and morphometry in the coproparasitological examination. Type 1 eggs have the characteristics of helminth eggs of the families Microsaphidiidae and Cladorchiidae, and the eggs of types 2, 3, and 4 have characteristics of helminth eggs of the family Spirorchiidae.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support in this research and Ifes for the financial contribution for publication. The experimental protocol adopted was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA/Ufes No. 52/2015) and authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMbio, SisBio No. 39329-2). All authors declare that there are no competing interests.

Greiner (2013) utilizó una técnica de sedimentación como principio de diagnóstico, de manera similar a este estudio. También se utilizó la técnica de Foreyt (2005) para describir las mediciones de huevos de las especies *C. albus*, *Charaxicephalus robustus*, *Pronochephalus obliquus* y *Schizamphistomum scleroporum*. Marangi et al. (2020) también realizaron exámenes coprológicos utilizando características morfológicas y morfométricas para identificar huevos, como lo reportó Greiner (2013).

La variación de tamaño en los huevos medidos dentro de los parásitos adultos puede estar relacionada con los ciclos de maduración de los huevos antes de su oviposición. En cuanto a la morfometría de los huevos en helmintos adultos, Werneck (2007) obtuvo resultados similares a los del presente estudio para las medidas de huevos de *C. albus*, *Cricocephalus megastomun*, *Deuterobaris proteus*, *M. invaginatum*, *N. travassosi*, *Pleurogonius longiusculus*, *Polyangium linguatula* y *P. obliquus*. Santoro et al. (2007), al examinar ejemplares adultos de *Pleurogonius tortugueroi* aislados de *C. mydas*, observaron huevos que midieron en promedio 27.00  $\mu\text{m}$  de largo por 14.00  $\mu\text{m}$  de ancho, valores cercanos a los encontrados en este trabajo para parásitos de otras especies del mismo género: *Pleurogonius linearis* (33.17  $\times$  15.98  $\mu\text{m}$ ), *Pleurogonius lobatos* (25.87  $\times$  12.41  $\mu\text{m}$ ) y *P. longiusculus* (24.67  $\times$  12.29  $\mu\text{m}$ ).

En este estudio, los helmintos *Deuterobaris intestinalis*, *D. proteus*, *N. travassosi* y *S. scleroporum* presentaron huevos de tamaños similares entre sí y morfométricamente similares al huevo tipo 1. Greiner (2013) identificó huevos similares a estos, de 98.00  $\times$  60.00  $\mu\text{m}$ , como *S. scleroporum* y *D. proteus*. Este mismo autor también reportó huevos similares a los tipos 2 y 3, pertenecientes a helmintos de los géneros *Carettacola* (88.00  $\times$  38.00  $\mu\text{m}$ ) y *Hapalotrema* (414.00  $\times$  36.00  $\mu\text{m}$ ), respectivamente, pertenecientes a la familia Spirorchiidae. Work (2005) encontró huevos similares a los tipos 2, 3 y 4 con medidas de 135.00  $\times$  67.00  $\mu\text{m}$ , 276.00  $\times$  37.00  $\mu\text{m}$  y 45.00  $\times$  30.00  $\mu\text{m}$ , respectivamente; estos fueron identificados como helmintos pertenecientes a la familia Spirorchiidae.

Algunos estudios que analizaron microscópicamente muestras de tejidos (bazo, pulmones, intestino, riñones y corazón) (Santoro et al. 2007b) y muestras fecales de *C. mydas* (Santoro et al. 2020) identificaron huevos similares a los tipos 3 y 4 de este estudio como correspondientes a huevos de helmintos espiroquidos (Digenea: Spirorchiidae) de los géneros *Hapalotrema* y *Neosporichis*, respectivamente. Jerdy et al. (2019) también registraron la observación de huevos en forma de espiral y apariencia circular, similares a especies del género *Neosporichis*, en tejido ocular de *C. mydas*. El hallazgo de huevos de helmintos de la familia Spirorchiidae en el examen coproparasitológico revela datos importantes para el estudio de la ecología de estos parásitos, ya que su ciclo de vida aún no está bien dilucidado (Chapman et al. 2019).

## REFERENCES

- Binoti E, Gomes MC, De Calais Junior A, Werneck MR, Martins IVF, Boeloni JN. 2016. Helminth fauna of *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) in the south of the Espírito Santo state in Brasil. *Helminthologia*. 53(2):195–199. <https://doi.org/10.1515/helmin-2016-0012>
- Chapman PA, Cribb TH, Flint M, Traub RJ, Blair D, Kyaw-Tanner MT, Mills PC. 2019. Spirorchiidiasis in marine turtles: the current state of knowledge. *Dis Aquat Org*. 133(3):217–245. <https://doi.org/10.3354/dao03348>
- Chapman PA, Owen H, Flint M, Soares-Magalhães RJ, Traub RJ, Cribb TH, Kyaw-Tanner MT, Mills PC. 2017. Molecular epidemiology and pathology of spirorchiid infection in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 6(1):39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.03.001>
- Fernandes BMM, Kohn A. 2014. South American trematodes parasites of amphibians and reptiles. Rio de Janeiro: Oficina de Livros. 228 p.
- Foreyt WJ. 2005. Parasitologia Veterinária. São Paulo: Roca. 240 p.
- Gomes MC, Martins IVF, Werneck MR, Pavanelli L. 2017. Ecologia da comunidade de helmintos gastrointestinais de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) recolhidas no litoral do Espírito Santo = Community ecology of gastrointestinal helminths from green turtles (*Chelonia mydas*) collected in the coast of Espírito Santo. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 69(3):644–650. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9039>
- Greiner EC. 2013. Parasites of marine turtle. In: Wyneken J, Lohmann KJ, Musick JA (eds.), *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press. p. 425–444.
- Greiner EC, Mader DR. 2006. Parasitology. In: Mader DR (ed.), *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier. p. 343–345.
- Jerdy H, Werneck M, Goldberg D, Baldassin P, Ferioli R, Maranhão A, Ribeiro R, Bianchi M, Ribeiro L, Shimoda E, et al. 2019. Ocular spirorchiidiosis in sea turtles from Brazil. *J Helminthol*. 94:E56. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1900049X>
- Marangi M, Carlino P, Profico C, Olivieri V, Totaro G, Furi G, Marzano G, Papini RA. 2020. First multicenter coprological survey on helminth parasite communities of free-living loggerhead sea turtles *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) from the Adriatic Sea and Northern Ionian Sea. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 11:207–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.006>
- Santoro M, Greiner EC, Morales JA, Rodríguez-Ortíz B. 2006. Digenetic trematode community in nesting green sea turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J Parasitol*. 92(6):1202–1206. <https://doi.org/10.1645/GE-866R.1>
- Santoro M, Greiner EC, Morales JA, Rodríguez-Ortíz B. 2007a. A new pronoccephalid, *Pleurogonius tortugueroi* n. sp. (Digenea), from the intestine of green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Costa Rica. *Parassitologia*. 49(1–2):97–100.
- Santoro M, Marchiori E, Cassini R, Drigo M, Iaccarino D, Di Nocera F, Degli-Uberti B, De Luca G, D'Amore M, Centellegher C, et al. 2020. Epidemiology of blood flukes (Digenea: Spirorchiiidae) in sea turtles from Tyrrhenian and Adriatic Seas, off Italy. *Parasites Vectors*. 13:52. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3922-9>
- Santoro M, Morales JA, Rodríguez-Ortíz B. 2007b. Spirorchiidiosis (Digenea: Spirorchiiidae) and lesions associated with parasites in Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet Rec*. 161(14):482–486. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.161.14.482>
- Stacy BA, Chapman PA, Foley AM, Greiner EC, Herbst LH, Bolten AB, Klein PA, Manire CA, Jacobson ER. 2017. Evidence of diversity, site, and host specificity of sea turtle blood flukes (Digenea: Schistosomatoidea: “Spirorchiiidae”): a molecular prospecting study. *J Parasitol*. 103(6):756–767. <https://doi.org/10.1645/16-31>
- Werneck MR. 2007. Helmintofauna de *Chelonia mydas* necropsiadas na Base do Projeto Tamar-Ibama em Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil [MSc thesis]. [Botucatu (SP)]: Universidade Estadual Paulista. 50 p.
- Werneck MR, Silva RJ. 2015. Helminth parasites of juvenile green turtles *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. *J Parasitol*. 101(6):713–716. <https://doi.org/10.1645/15-780>
- Work TM, Balazs GH, Schumacher JL, Marie A. 2005. Epizootiology of spirorchiid infection in green turtles (*Chelonia mydas*) in Hawaii. *J Parasitol*. 91(4):871–876. <https://doi.org/10.1645/GE-454R.1>

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior (CAPES) el apoyo en esta investigación y al Ifes el aporte económico para su publicación. El protocolo experimental adoptado fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso Animal (CEUA/Ufes No. 52/2015) y autorizado por el Instituto Chico Mendes para la Conservación de la Biodiversidad (ICMBio, SisBio No. 39329-2). Todos los autores declaran que no existen intereses contrapuestos.

Traducido al español por Claudia Michel-Villalobos.

Received 05 October 2020,  
accepted 28 August 2021.