



## Ocorrência de hemogregarina em duas espécies de cágados brasileiros\*

### Occurrence of Hemogregarine in Two Species of Brazilian Freshwater Turtles

Lourdes Marina Bezerra Pessoa<sup>1</sup>, Marcela Corrêa Scalon<sup>2</sup>, Filipe Tavares Carneiro<sup>1</sup>, Máira Gonçalves da Mota Lima<sup>2</sup>, Thamiris Figueiredo da Silva<sup>2</sup>, Rafael Veríssimo Monteiro<sup>2</sup> & Giane Regina Paludo<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

**Background:** Hemogregarines are the most common intraerythrocytic parasites found in reptiles. The genus *Haemogregarina* has aquatic vertebrates as intermediate hosts, and as definitive hosts the leeches. The genus *Hepatozoon* can be found parasitizing amphibians, reptiles, birds and mammals and its main vectors invertebrates are mosquitoes, tsetse flies, lice, fleas and mites. The diagnosis of these parasites is done by the technique of blood smear, but modern diagnoses include evaluation of blood by polymerase chain reaction (PCR). The aim this study was to determine the occurrence of infection by hemogregarine in freshwater turtles, through PCR.

**Materials, Methods & Results:** Samples from 99 freshwater turtles of species *P. expansa* and *P. geoffroanus* of Fundação Zoológico de Brasília, Distrito Federal, Brazil, were used. The animals was captured using a hand net, and were immediately individually identified. The blood samples was collected by puncture of the occipital sinus, and placed into tubes containing sodium heparin anticoagulant for hematologic and molecular analysis. Two different sets of oligonucleotides were used, one to detect hemogregarines and other to detect *Hepatozoon* sp. infection. The presence of hemogregarine was detected in 20 samples analyzed (n = 99), these eleven samples were positive for hemogregarine, 5 were *Hepatozoon* sp. and 4 were positive for both oligonucleotides. Laboratory abnormalities were observed in the concentration of total plasma proteins, total serum proteins and globulin, and in the number of thrombocytes in animals positive for hemogregarines and only alterations in the number of thrombocytes were observed in *Hepatozoon* sp. positive animals of both species.

**Discussion:** This study showed that there is a high occurrence of infection by hemogregarines in the freshwater turtles samples examined. The remarkable difficulty of identifying morphological differences, combined with the development of universal oligonucleotides, make further assessments infections hematozoa to be performed using molecular tools and specially sequencing of the 18S rRNA gene for hemogregarines. Protein levels in animals depends on the management, diets and normal physiological variations of each species. Hypoproteinemia is commonly observed in reptiles with chronic malnutrition and gastrointestinal parasitism. Therefore it is suggested that the cause of this low level in the measurement of proteins could be directly linked to the presence of hemoparasites because with the infection more animals feeding unless the negative, causing malnutrition, or even the concomitant presence of gastrointestinal parasites, because the study did not evaluate this level of parasitism. Thrombocytes in reptiles participate in blood clotting and some studies have shown that they also have phagocytic capacity. Thrombocytopenia in reptiles is usually a result of excessive use or deficient production. Thus, thrombocytopenia observed in hemogregarines positive animals of this study may suggest that the presence of this group of parasites can cause thrombocytopenia that may be associated with a deficient production of thrombocytes or even greater consumption of these blood cells. The increase of thrombocytes observed in animals positive for *Hepatozoon* sp. may be related to the defense of the animal, since thrombocytes also have phagocytic activity. No changes were observed in laboratorial tests of *P. expansa*, which may be due to the small number of this animal species analyzed.

**Keywords:** hemoparasites, freshwater turtles, PCR, hemogregarine, *Hepatozoon*.

## INTRODUÇÃO

As hemogregarinas são parasitas intraeritrocitários mais comumente observadas em répteis [10,35]. O gênero *Haemogregarina* possui como hospedeiros intermediários os vertebrados aquáticos, e as sanguessugas como os hospedeiros definitivos [28,29,30]. Já o gênero *Hepatozoon* parasita os anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Os principais vetores invertebrados de *Hepatozoon* são mosquitos, moscas tse-tse, triatomíneos, piolhos, pulgas e ácaros [31].

Pouco se sabe acerca dos efeitos fisiológicos de infecções com hemoparasitas sobre espécies de cágados brasileiros. Sabe-se que baixos níveis de parasitismo parecem não afetar a saúde do organismo hospedeiro [4], no entanto, em hospedeiros não naturais, podem alcançar proporções significativas em condições de cativeiro, quando não há rígido controle parasitológico, justificando-se a necessidade de um bom diagnóstico para evitar a disseminação das doenças dentro das populações cativas. O diagnóstico dessas parasitoses é feito pela técnica do esfregaço sanguíneo [2,24], mas, atualmente, diagnósticos mais modernos incluem a avaliação do sangue pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) [35].

Diante disso o presente estudo propôs determinar a ocorrência de hemogregarinas em cágados mantidos na Fundação Zoológico de Brasília, por meio da PCR e as alterações laboratoriais decorrentes destas infecções.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Delineamento experimental*

Foram utilizadas amostras de sangue de 99 espécimes de cágados, sendo 77 da espécie *Phrynosoma geoffroanus* (Cágado-de-barbicha) e 22 *Podocnemis expansa* (Tartaruga-da-Amazônia), de diferentes faixas etárias, machos e fêmeas, pertencentes ao acervo da Fundação Zoológico de Brasília. Os animais foram capturados do recinto de exposição e do lago da instituição, com a utilização de um puçá, sendo imediatamente identificados individualmente por microchips, após realização de exame clínico completo. As amostras de sangue foram colhidas por punção do seio occipital, de acordo com a técnica descrita por Martínez-Silvestre et al. [16], e acondicionadas em dois tubos, um seco e estéril, e outro contendo anticoagulante heparina sódica. Imediatamente após a colheita foram preparados dois

esfregaços sanguíneos, com o sangue de cada animal para pesquisa direta de hemoparasitas. Ressaltamos que as amostras contaminadas por hemolinfa foram descartadas. As análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

### *Metodologia*

As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foram feitas em câmara de Neubauer improved®. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita pelo método colorimétrico. O volume globular (VG) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito com a utilização de capilares sem heparina e microcentrífuga (Mod. MH)<sup>1</sup>, enquanto as proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro portátil. O sangue restante foi refrigerado para realização dos estudos de caracterização molecular pela técnica da PCR.

Para avaliação das análises bioquímicas foi separado soro das amostras acondicionadas em tubos sem anticoagulante. Foram utilizados kits bioquímicos específicos<sup>2</sup>, seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semi-automático (Bio2000)<sup>3</sup> para determinação dos valores séricos de úrea, ácido úrico, cálcio, creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), fósforo, proteína total (PT), albumina, globulina e glicose.

O DNA das amostras foi extraído a partir de 10 µL de sangue para a realização do exame molecular (PCR) com auxílio de kits comerciais (Illustra Blood genomic)<sup>4</sup>, seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. Após extração, as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até o momento do uso.

Após as extrações todas as amostras foram submetidas a PCR para detecção de hemogregarinas, utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos (Tabela 1) que detectam regiões do gene 18S rRNA, onde o conjunto de oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2 pode amplificar gêneros do grupo das hemogregarinas e alguns parasitas apicomplexas (*Hepatozoon* sp., *Babesia* sp., *Theileria* sp., *Hemolivia* sp., *Haemogregarina* sp.) [25], enquanto o HEPR/HEPF são específicos para amplificar parasitas do gênero *Hepatozoon* sp. [13].

A reação do mix para a PCR da HEP foi composta de tampão 1X de PCR, 10 ng de DNA, 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada de oxinucleotídeo, 0,5

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos, tamanho dos produtos de amplificação e referência bibliográfica das reações de PCR utilizadas.

| Reação/Oligonucleotídeos | Sequência 5'-3'                | Tamanho | Referência                   |
|--------------------------|--------------------------------|---------|------------------------------|
| <b>Hemogregarinas</b>    |                                |         |                              |
| HEMO1                    | TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG | 1000 pb | Perkins e Keller (2001)      |
| HEMO2                    | CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTAC  |         |                              |
| <b>Hepatozoon sp.</b>    |                                |         |                              |
| HEPF                     | ATACATGAGCAAATCTCAAC           | 652 pb  | Inokuma <i>et al.</i> (2002) |
| HEPR                     | CTTATTATTCCATGCTGCAG           |         |                              |

µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol) e 1 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 min seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 30 s, 52°C por 30 s e 72°C por 90 s) e extensão final a 72°C por 5 min, de acordo com o descrito em Inokuma *et al.* [13]. Para a reação do mix para a PCR da HEMO foi utilizado a composição de tampão 1X de PCR, 10 ng de DNA, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada de oxinucleotídeo, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol) e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 min, 48°C por 1 min e 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C por 5 min, de acordo com o descrito em Perkins e Keller [25]. Cada reação foi checada para contaminação pelo uso de controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o DNA. Todas as reações de amplificação foram realizadas no mesmo aparelho termociclador (C1000TM Thermal Cycler)<sup>5</sup>.

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (Vetec)<sup>6</sup> e observados sob transiluminador (UV Transilluminator UVP<sup>®</sup>)<sup>7</sup> de fluorescência ultravioleta. Um marcador molecular<sup>8</sup> com intervalos de pesos moleculares de 100pb foi incluído em cada eletroforese como um padrão de comparação de altura das bandas para determinação do tamanho do produto amplificado. O aparecimento de bandas na altura dos pares de bases esperadas foi considerado o parâmetro para classificar as amostras como positivas. Em todas as PCRs foram utilizados como controle negativo água miliQ (estéril e desprovida de DNA). Como controles positivos, para as PCRs de HEMO e HEP, foram utilizadas amostras de animais da mesma espécie positivos na microscopia

óptica e que apresentaram positivos no teste da PCR padrão e contrateste.

#### Análise estatística

Na análise estatística foi testada a hipótese de que as infecções por hemogregarinas identificados por exame molecular (hemogregarina e *Hepatozoon* sp.) eram associados a modificação nos parâmetros de saúde analisados. Para isso foi primeiro criado um modelo misto linear, utilizando as espécies analisadas (*Phrynosops geoffroanus* e *Podocnemis expansa*) e o recinto de origem (lago e recinto de exposição) como fatores aleatórios e as infecções como fatores fixos, para testar cada uma das variáveis de saúde. Depois as espécies foram separadas e testado um modelo linear para cada espécie em separado, utilizando como fatores fixos, novamente, a infecção por hemoparasitas. Com auxílio do software R<sup>®</sup> e o pacote lme4 para execução das análises, considerando o intervalo de confiança de 95%.

#### RESULTADOS

Das 99 espécimes de cães estudados, 20,21% (20/99) foram positivas para presença de hemogregarinas em alguma das PCRs realizadas, sendo que na PCR para hemogregarinas foram observadas 15,15% (15/99) amostras positivas e na PCR para o gênero *Hepatozoon* sp. foram encontradas 9,09% (9/99) cães positivos. Cabe salientar que 5 animais foram positivos somente na PCR para *Hepatozoon* sp., ou seja, não amplificaram na PCR para hemogregarinas, 11 foram positivos somente para PCR para hemogregarinas e quatro foram positivos nas duas reações utilizadas (Tabela 2). Importante observar que três animais foram negativos no exame direto, mas apresentaram-se positivos no teste para PCR para hemogregarinas, comprovando a sensibilidade dos exames moleculares.

**Tabela 2.** Número de cães positivos nos testes realizados.

| Método           | M.O Positivos (66/99) | Total de Positivos |
|------------------|-----------------------|--------------------|
| PCR "HEMO"       | 8                     | 11                 |
| PCR "HEP"        | 9                     | 9                  |
| PCR "HEMO"+"HEP" | 4                     | 4                  |
| TOTAL            | 17                    | 20                 |

"HEMO": PCR para o grupo das hemogregarinas; "HEP": PCR para o gênero *Hepatozoon* sp.; M.O: microscopia óptica

Foram observados hemoparasitas em 50,5% (50/99) dos animais amostrados e que não foram identificados pelos testes moleculares realizados. Na análise morfológica estes parasitas apresentaram forma cilíndrica e ocupavam posições laterais dentro do eritrócito, na presença desse organismo foi observada também um alargamento das células hospedeiras e deslocamento lateral do núcleo (Figura 1).

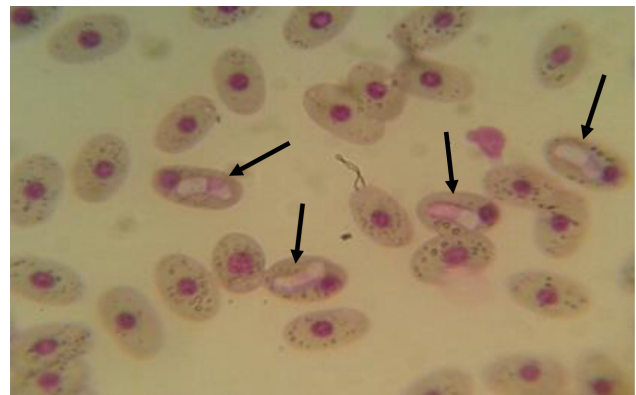
Nas amostras positivas obtidas pela PCR para hemogregarinas foi observado produto de 1000pb (Figura 2) e na PCR específica para o gênero *Hepatozoon* sp. as amostras positivas geraram produtos de aproximadamente 600pb (Figura 3).

Nas infecções por hemogregarinas foram observadas diminuições ( $P < 0,05$ ) nas concentrações das proteínas plasmáticas totais, das proteínas séricas totais, das globulinas e no número de trombócitos em ambas as espécies (Tabela 3). Nas infecções por *Hepatozoon* sp. foram observadas apenas aumento no número de trombócitos (Tabela 4).

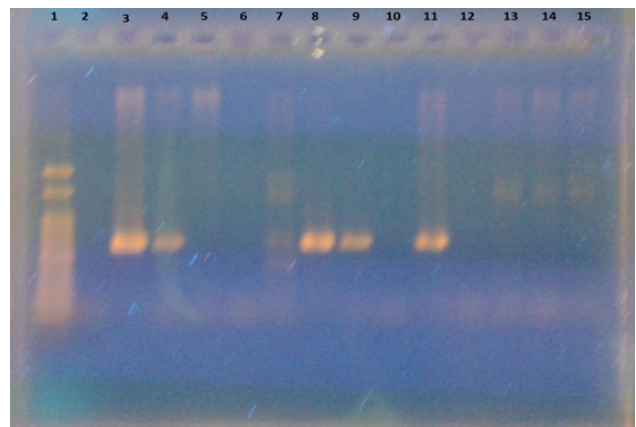
Quando analisadas as espécies separadamente, observou-se na espécie *P. geoffroanus* uma diminuição em relação à média nos parâmetros de proteínas plasmáticas, trombócitos e globulinas nos animais com infecção por hemogregarinas, e nenhuma alteração foi observada para infecção com *Hepatozoon* sp. (Tabela 5). Na espécie *P. expansa* não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros analisados.

#### DISCUSSÃO

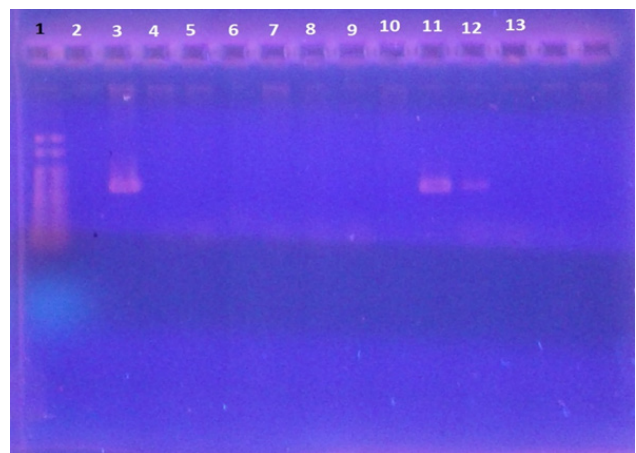
O presente estudo mostrou que existe uma elevada ocorrência de infecção por hemogregarinas nos cães mantidos na Fundação Zoológico de Brasília, pois foram encontradas amostras positivas tanto na PCR quanto no exame direto. Salientando que a ocorrência hemogregarina pelo exame direto foi muito superior ao encontrado para os exames moleculares, o que faz sugerir que outra espécie de hemoparasita esteja infectando as espécies de cães e com alta prevalência na população amostrada. Confirmando assim o que afirmou Harris *et al.* [11], que



**Figura 1.** Eritrócitos de um cão de barbicha (*Phrynosoma geoffroanus*) do estudo onde se observa a presença de hemoprotzoários (setas), salientando que esses animais foram negativos para os testes de PCR utilizados no estudo.



**Figura 2.** Resultado de PCR para detecção de hemoparasitos utilizando os oligonucleotídeos para detecção de hemogregarinas. 1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2: controle negativo (água); 3: controle positivo; 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14 e 15 - animais negativos; 4, 8, 9 e 11 - animais positivos para o grupo das hemogregarinas. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).



**Figura 3.** Resultado de PCR para detecção de hemoparasitos utilizando os oligonucleotídeos para detecção de *Hepatozoon* spp.: PCR "HEP". 1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2: controle negativo (água); 3: controle positivo; 11 e 12 - animais positivos para *Hepatozoon* spp.; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 13 - animais negativos. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

**Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais positivos e negativos para infecção por hemogregarinas na PCR nas duas espécies estudadas (n = 99).

|             | Parâmetro   | Negativos (79/99) | Positivos (15/20) |
|-------------|---|-------------------|-------------------|
| Hemograma   | VG (%)  | 22,68 (±4,67)     | 23,53 (±3,96)     |
|             | Hemácias (x10 <sup>6</sup> xµL <sup>-1</sup> )    | 0,36 (±0,13)      | 0,37 (±0,14)      |
|             | Hemoglobina (g/dL)                                | 5,17 (±1,65)      | 5,29 (±1,58)      |
|             | Trombócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> ) | 5,1 (± 4,31)      | 3,73 (±3,7)*      |
|             | PPT (g/dL)  | 4,5 (±1,67)       | 3,6 (±1,43)**     |
|             | Leucócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> )  | 8,23 (± 5,6)      | 6,06 (±4,01)      |
| Bioquímicos | FA (UI/L)   | 11,9 (±64,9)      | 131,06(±105,47)   |
|             | AST(UI/L)   | 68,5 (±36,4)      | 61,66(±24,08)     |
|             | Glicose (md/dL)                                   | 70,01 (±51,5)     | 57,53(±21,11)     |
|             | Ca (Meq/L)  | 11,37(±3,68)      | 11,18 (±4,32)     |
|             | Uréia (mg/dL)                                     | 16,46 (±18,03)    | 24,8 (±27,57)     |
|             | Proteína Total (g/dL)                             | 4,0(±1,24)        | 3,7 (±1,71)***    |
|             | Albumina (g/dL)                                   | 1,37 (±0,59)      | 1,31 (±0,43)      |
|             | Globulina (g/dL)                                  | 2,5 (±1,02)       | 2,1 (±1,29)****   |
|             | Ácido úrico (mg/dL)                               | 2,5 (±5,9)        | 1,55 (±1,3)       |
|             | Fósforo (mg/dL)                                   | 2,61 (±2,63)      | 2,98 (±1,56)      |
|             | CK (UI/L)   | 1773 (±1752)      | 1048,9 (±749,24)  |

\*valores significativamente diferentes (\*P < 0.05;\*\* P < 0.01;\*\*\* P < 0.001;\*\*\*\* P < 0.05); Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK) e Ca (Cálcio).

**Tabela 4.** Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais positivos e negativos para infecção por *Hepatozoon* sp. na PCR nas duas espécies estudadas (n = 99).

|             | Parâmetro   | Negativos (79/99) | Positivos (9/20) |
|-------------|---|-------------------|------------------|
| Hemograma   | VG (%)  | 22,68 (±4,67)     | 20,6 (±7,15)     |
|             | Hemácias (x10 <sup>6</sup> xµL <sup>-1</sup> )    | 0,36 (±0,13)      | 0,26 (±0,17)     |
|             | Hemoglobina (g/dL)                                | 5,17 (±1,65)      | 5,76 (±2,28)     |
|             | Trombócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> ) | 5,1 (± 4,31)      | 7,38 (±2,13)*    |
|             | PPT (g/dL)  | 4,03 (±1,67)      | 3,11 (±1,34)     |
|             | Leucócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> )  | 8,23 (± 5,6)      | 4,5 (±2,57)      |
| Bioquímicos | FA (UI/L)   | 11,9 (±64,9)      | 63 (±20,05)      |
|             | AST(UI/L)   | 68,5 (±36,4)      | 55,33(±29,21)    |
|             | Glicose (md/dL)                                   | 70,01 (±51,5)     | 46,22(±13,94)    |
|             | Ca (Meq/L)  | 11,37(±3,68)      | 11,22 (±5,26)    |
|             | Uréia (mg/dL)                                     | 16,46 (±18,03)    | 33,22 (±47,37)   |
|             | Proteína Total (g/dL)                             | 3,87(±1,24)       | 2,97 (±1,1)      |
|             | Albumina (g/dL)                                   | 1,37 (±0,59)      | 1,16 (±0,45)     |
|             | Globulina (g/dL)                                  | 2,53 (±1,02)      | 2,13 (±0,75)     |
|             | Ácido úrico (mg/dL)                               | 2,5 (±5,9)        | 2,92 (±1,06)     |
|             | Fósforo (mg/dL)                                   | 2,61 (±2,63)      | ***              |
|             | CK (UI/L)   | 1773 (±1752)      | 412,33 (±687,26) |

\*valores significativamente diferentes (P < 0.005); \*\*\* = Valores não mensurados nos animais; Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK) e Ca (Cálcio).

**Tabela 5.** Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos cães positivos e negativos para a infecção por hemogregarinas na PCR na espécie *Phrynosoma geoffroanus* (n = 77).

|             | Parâmetro   | Negativos (64/77) | Positivos (12/77) |
|-------------|---|-------------------|-------------------|
| Hemograma   | VG (%)  | 22,98 (±4,17)     | 24 (±2,79)        |
|             | Hemácias (x10 <sup>6</sup> xµL <sup>-1</sup> )    | 0,39 (±0,11)      | 0,43 (±0,12)      |
|             | Hemoglobina (g/dL)                                | 5,08 (±1,32)      | 5,06 (±1,0)       |
|             | Trombócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> ) | 14,09 (±4,4)      | 12,03 (±6,4)*     |
|             | PPT (g/dL)  | 3,14 (±1,66)      | 2,23 (±0,86)**    |
|             | Leucócitos (x10 <sup>3</sup> xµL <sup>-1</sup> )  | 9,21(±5,7)        | 6,54 (±4,14)      |
| Bioquímicos | FA (UI/L)   | 125,7 (±64,23)    | 148 (±111,59)     |
|             | AST(UI/L)   | 68,32 (±37,92)    | 63,25(±19,92)     |
|             | Glicose (md/dL)                                   | 76,56 (±54,21)    | 61,66(±20,37)     |
|             | Ca (Meq/L)  | 11,55(±3,36)      | 11,22 (± 3,03)    |
|             | Uréia (mg/dL)                                     | 14,75(±16,7)      | 22,58(±14,5)      |
|             | Proteína Total (g/dL)                             | 4,05(±1,23)       | 4,75(±1,67)       |
|             | Albumina (g/dL)                                   | 1,34 (±0,53)      | 1,29 (±0,44)      |
|             | Globulina (g/dL)                                  | 2,76 (±0,85)      | 2,36 (±1,24)***   |
|             | Ácido úrico (mg/dL)                               | 2,4 (±7,2)        | 1 (±0,6)          |
|             | Fósforo (mg/dL)                                   | 3,25 (±2,71)      | 3,23 (±1,36)      |
|             | CK (UI/L)   | 1790,1 (±1737,2)  | 1244,4(±685,95)   |

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $P < 0,05$ ) no teste de modelo linear. \* $P < 0,005$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,05$ ; Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK) e Ca (Cálcio).

os níveis de infecção relatados de estudos utilizando diferentes oligonucleotídeos devem, portanto, ser comparados com cautela. Outros estudos com cães, em diferentes regiões do mundo, também revelaram uma alta ocorrência de parasitismo por hemoparasitas [7,14,15,17,18,20,23,26,28].

Os parasitas observados na microscopia óptica apresentavam características morfológicas similares as hemogregarinas descritas por Telford Jr. [32] e Thrall *et al.* [33]. No entanto, a precisão na identificação só é possível com a combinação da descrição dos estágios esporogonia no vetor [9], no presente estudo não foi realizada a observação do ciclo biológico, impossibilitando esta classificação.

A notável dificuldade de identificar as diferenças morfológicas, combinada com o desenvolvimento de oligonucleotídeos universais, fazem com que mais avaliações de infecções por hematozoários sejam realizadas utilizando ferramentas moleculares e, em particular, o sequenciamento do gene de 18 SrRNA para hemogregarinas [5,9,14,34]. Importante salientar que Criado-Fornelio *et al.* [5,6], relataram a descoberta de resultados não positivos ao examinar esfregaços de sangue, mas obtiveram resultados positivos através de PCR e metodologias de sequenciamento de DNA, o

que foi observado no presente estudo, onde três animais foram positivos na PCR e negativos na microscopia óptica. No presente estudo, observou-se uma diferença significativa na sensibilidade de detecção entre as duas metodologias, sendo observada uma maior ocorrência de animais positivos na microscopia óptica em relação a PCR. Isto pode ter ocorrido devido aos conjuntos de oligonucleotídeos utilizados serem específicos para amplificarem apenas o gene 18S rRNA das hemogregarinas, não conseguindo amplificar os genes de outros hemoparasitas presentes nas amostras, tais resultados foram similares aos encontrados por Moço *et al.* [22], que conduziram estudos moleculares com *Hepatozoon* sp. de *Caudisoma durissa terrificata* utilizando os oligonucleotídeos que amplificaram regiões do gene 18S rRNA não conseguiram detectar todos os hemoparasitas que infectavam os animais estudados. Enquanto no estudo de Moço [21], foram testados outros oligonucleotídeos, que amplificaram a região ITS-1, 5.8S e ITS-2 e outros que amplificaram regiões do gene 18S rRNA, conseguiram sequências que identificaram um maior número de espécies de hemoparasitas. Assim, provavelmente, se tivéssemos utilizado associações de outros oligonucleotídeos, poderíamos ter obtido uma maior ocorrência de

hemogregarinas identificadas pelos testes moleculares. Ainda ressaltamos a presença de quatro animais positivos apenas para PCR do *Hepatozoon sp.*, o que sugere que possa existir diferenças gênicas no sítio de anelamento dos oligonucleotídeos para hemogregarinas, corroborando a necessidade de estudos futuros utilizando outros conjuntos de oligonucleotídeos.

Os animais silvestres tendem a manifestar poucos sinais reconhecíveis de doenças, sendo os exames laboratoriais considerados como ferramentas para diagnosticar e prevenir doenças e até mesmo como bioindicadores de agressões ambientais [1]. No presente estudo não foram observadas alterações clínicas nos animais. Nas análises laboratoriais de hemograma e bioquímica, como não tínhamos padrão hematológico como referência para as espécies estudadas, foram utilizados animais negativos para hemogregarina na PCR como referência. Assim, comparamos os exames realizados com os resultados dos animais positivos nos exames moleculares, sendo encontradas diferenças nos animais positivos para hemogregarinas para os parâmetros de proteínas plasmáticas totais, proteínas séricas totais, globulinas e trombócitos; já para os positivos para *Hepatozoon sp.* obtivemos alterações apenas no parâmetro dos trombócitos para ambas as espécies. Quando comparadas as espécies separadamente observamos alterações nos exames para a espécie *P. geoffroanus* nos animais positivos no teste molecular para hemogregarinas. Nos animais positivos para hemogregarinas, obteve-se uma mensuração de proteínas plasmáticas totais, proteínas séricas totais e globulinas abaixo dos valores médios observados nos animais negativos. Sabendo que os níveis de proteínas nos animais depende do manejo, dietas e variações fisiológicas normais de cada espécie [27], e que a hipoproteinemia é comumente observada em répteis com desnutrição crônica e parasitismo gastrointestinal [8]. Outras causas, no entanto, tais como má absorção, má digestão, enteropatia perdedora de proteínas, perda grave de sangue, e doença hepática ou doença renal crônica, devem também ser considerados [3]. Os trombócitos nos répteis possuem como função principal participar da coagulação sanguínea e alguns estudos demonstram que também possuem capacidade fagocitária [1]. Trombocitopenia em répteis geralmente é resultado de excessiva utilização ou deficiente produção de trombócitos [12]. Assim, a trombocitopenia observada nos animais positivos para hemogregarinas no estudo pode sugerir que a presença de parasitas desse grupo pode causar uma trombocitopenia que pode estar associada a uma

produção deficiente dos trombócitos ou mesmo um consumo maior destas células sanguíneas. Já o aumento dos trombócitos observados nos animais positivos para *Hepatozoon sp.* pode sugerir que a infecção por este parasita causa um aumento desses trombócitos sem alteração de nenhum outro parâmetro avaliado o que pode estar relacionada a defesa do animal, já que os trombócitos também possuem atividade fagocitária. Nenhuma alteração foi observada nos exames das *P. expansa* para os testes moleculares realizados, o que pode ter ocorrido devido ao número reduzido de animais desta espécie analisados no estudo com poucas amostras positivas.

## CONCLUSÃO

A pesquisa realizada com as espécies *P. expansa* e *P. geoffroanus* revelou ocorrência de infecção por hemogregarinas por meio da PCR em 20,21% das amostras analisadas, similar o que a literatura menciona, sobre uma prevalência e intensidade alta de infecção de cães por hemoparasitas. Na microscopia óptica pode-se observar uma ocorrência maior de infecção que nas análises moleculares, o que denota a possibilidade de existência de outras espécies de hemoparasitas infectando esses cães que não foram possíveis de serem identificados pelos oligonucleotídeos utilizados no estudo. Assim, estudos subsequentes, utilizando marcadores moleculares adicionais, deverão ser realizados para identificar esses parasitas e avaliar mais precisamente os efeitos que estes parasitismos podem causar na saúde das espécies de cães da instituição.

## MANUFACTURERS

<sup>1</sup>CELM. Barueri, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Labtest. Lagoa Santa, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Bioplus. Barueri, SP, Brazil.

<sup>4</sup>GE Healthcare. Piscataway, NJ, USA.

<sup>5</sup>Biorad®. Hercules, CA, USA.

<sup>6</sup>Sigma-Aldrich®. St. Louis, MO, USA.

<sup>7</sup>Benchtop UV Transilluminators. Upland, CA, USA.

<sup>8</sup>Invitrogen. São Paulo, SP, Brazil.

**Ethical approval.** Os métodos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal, CEUA UNB (UnBDOC N°154161/2013) e a captura e a manipulação dos animais foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (N° 38444-4).

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Almosny N.R.P. & Monteiro A.O. 2007. Patologia Clínica. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão Dias J.L. (Eds). *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo: Roca, pp.939-966.
- 2 Campbell T.W. 1996. Hemoparasites. In: Mader D.R. (Ed). *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.379-381.
- 3 Campbell T.W. 2014. Clinical pathology. In: Mader D.R. (Ed). *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.543-470.
- 4 Caudell J.N., Whittier J. & Conover M.R. 2002. The effects of haemogregarine- like parasites on brown tree snakes (*Boiga irregularis*) and slatey-grey snakes (*Stegonotus cucullatus*) in Queensland, Australia. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 49: 113-119.
- 5 Criado-Fornelio A., Buling A., Casado N., Gimenez C., Ruas J., Wendt L., Da Rosa-Freitas N., Pinheiro M., Rey-Valeiron C. & Barba-Carretero J.C. 2009. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. *Acta Parasitologica*. 54: 187-193.
- 6 Criado-Fornelio A., Ruas J.L., Casado N., Farias N.A.R., Soares M.O., Muller G., Brum J.G.W., Berne M.E.A., Buling-Sarana A. & Barba-Carretero J.C. 2007. New molecular data mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*. 92: 93-99.
- 7 Davis A.K. & Sterrett S.C. 2011. Prevalence of Haemogregarine parasites in three freshwater turtle species in a population in Northeast Georgia, USA. *International journal of zoological Research*. 7(2): 156-163.
- 8 Deem S.L., Norton T.M., Mitchell M., Segars A., Alleman A.R., Cray C., Poppenga R.H., Dodd M. & Karesh W.B. 2009. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded Loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *Journal Wildlife Disease*. 45: 41-56.
- 9 Dvořáková N., Kviřerová J., Hostovský M. & Široký P. 2015. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. *Parasitology*. 142: 816-826.
- 10 Garcia-Navarro C.E.K. & Pachaly J.R. 1994. *Manual de hematologia veterinária*. São Paulo: Livraria Varela, 169p.
- 11 Harris D.J., Maia J.P.M.C. & Perera A. 2011. Molecular Characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology*. 97(1): 106-110.
- 12 Hawkey C.M. & Dennet T.B. 1989. *Comparative veterinary haematology*. Ipswich: W.S. Cowell Ltd., 192p
- 13 Inokuma H., Okuda M., Ohno K., Shimoda K. & Onishi T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*. 106(3): 265-271.
- 14 Jakes K.A., Donoghue P.O., Munro M. & Adlard R. 2001. Hemoprotozoa of freshwater turtles in queensland. *Journal of Wildlife Diseases*. 37: 12-19.
- 15 Javanbakht H. & Sharifi M. 2014. Prevalence and intensity of Haemogregarina stepanowi (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in two species of freshwater turtles (*Mauremys caspica* and *Emys orbicularis*) in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2(4): 155-158.
- 16 Martinez-Silvestre A., Perpiñán D., Marco I. & Lavin S. 2002. Venipuncture Technique of the Occipital Venous Sinus in Freshwater Aquatic turtles. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 12(4): 31-32.
- 17 McAllister C.T. & King A.W. 1980. Hemogregarines in the red-eared slider, *Chrysemys scripta elegans* (Wied) from Arkansas. *Proceedings of Arkansas Academy of Science*. 34: 124
- 18 McAllister C.T., Upton S.J. & Trauth S.E. 1995. Hemogregarines (Apicomplexa) and *Falcaustra chelydrae* (Nematoda) in an alligator sapping turtle, *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudinidae), from Arkansas. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 62: 74-75.
- 19 Merino S., Vasquez R.A., Martinez J., Celis-Diez J.L., Gutierrezjimenez L., Ippi S, Sanchez-Monsalvez I. & La Puente J.M. 2009. Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the 'living fossil' marsupial 'Monito del Monte' *Dromiciops gliroides* from Chile. *Biological Journal of the Linnean Society*. 98: 568-576.
- 20 Mihalca A.D., Achelaripei D. & Popescu P. 2002. Hemoparasites to the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Valcea country, Romania. *Revista Scientia Parasitologica*. 3: 22- 27.
- 21 Moço T.C. 2012. Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de *Hepatozoon spp.* (Apicomplexa, Hepatozoidae) de serpentes brasileiras naturalmente infectadas. 91f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Biologia Geral



Aplicada) - Programa de Pós-graduação em Biologia Geral Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Biológicas de Botucatu.

- 22 Moço T.C., Silva R.J., Madeira N.G., Paduan K.S., Rubini A.S., Leal D.D.M. & O'dwyer L.H. 2011. Morphological, morphometric and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisona durissa terrifica*. *Parasitology Research*. 110(4): 1393-1401.
- 23 Molla S.H., Bandyopadhyay P.K. & Gürelli G. 2013. On the Occurrence of a *Haemogregarinae* (Apicomplexa) Parasite from freshwater Turtles of South 24 Parganas, West Bengal, India. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. 37: 118-122.
- 24 O'dwyer L.H., Moço T.C., Barella T.H., Vilela F.C. & Silva R.J. 2003. Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured Brazilian snakes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55: 309-314.
- 25 Perkins S.L. & Keller A.K. 2001. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology*. 87: 870-876.
- 26 Pierce M.A. & Adlard R.D. 2004. Haemoparasites from clinical screening of reptiles in south-east Queensland, Australia. *The Veterinary Record*. 155: 708-709.
- 27 Santos A.L.Q., Malta T.S., Mundim A.V., Alves Júnior J.R.F. & Carvalho S.F.M. 2005. Variação dos constituintes bioquímicos sanguíneos de tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*, Schweigger 1812) (Testudinata) mantidas em criatório comercial. *Archives of Veterinary Science*. 10(3): 1-8.
- 28 Siddall M.E. & Desser S.S. 1992. Prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa, Adeleina, Haemogregarinidae) in three turtle species from ontario, with observations on intraerythrocytic development. *Canadian Journal of Zoology*. 70: 123-128.
- 29 Siddall M.E. & Desser S.S. 2001. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech *Placobdella ornata*. *Journal of Parasitology*. 87: 1217-1218.
- 30 Siddall M.E. 1995. Phylogeny of Adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 24: 1161-1165.
- 31 Smith T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*. 82: 565-585
- 32 Telford Jr. S.R. 2000. Diagnosis of Reptilian Protozoal Infections. In: Fudge A.M. (Ed.). *Laboratory Medicine Avian and Exotic pets*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.259-260.
- 33 Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., De Nicola D., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A. & Weiser G. 2007. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca, pp.259-260.
- 34 Vilcins I.E., Ujvari B., Old J.M. & Deane E. 2009. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern territory, Australia. *Journal of Parasitology*. 95: 434-442.
- 35 Wosniak E.J., Mclaughlin G.L. & Telford S.R. 1994. Description of the vertebrate stages of a *Hemogregarine* species naturally infecting Mojave desert sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 25(1): 103-110.

