

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES:
APLICABILIDADE DE ALGUMAS REGIÕES GÊNICAS
MITOCONDRIAIS NA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E
ANÁLISE FILOGENÉTICA**

ERICSON RAMOS DE MELLO

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES
SILVESTRES: APLICABILIDADE DE ALGUMAS
REGIÕES GÊNICAS MITOCONDRIAIS NA
DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E ANÁLISE
FILOGENÉTICA**

ERICSON RAMOS DE MELLO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Bruno Pereira Berto

e coorientação da Professora

Dra. Viviane Moreira de Lima

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Junho, 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M527i Mello, Ericson Ramos de, 1985-
IDENTIFICAÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES:
APLICABILIDADE DE ALGUMAS REGIÕES GÊNICAS
MITOCONDRIAIS NA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES E ANÁLISE
FILOGENÉTICA / Ericson Ramos de Mello. - Rio de
Janeiro, 2023.
235 f.: il.

Orientador: Bruno Pereira Berto.
Coorientador: Viviane Moreira de Lima.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2023.

1. coccídios. 2. biologia molecular. 3. Isospora.
4. PCR. 5. COI. I. Berto, Bruno Pereira , 1984-,
orient. II. Lima, Viviane Moreira de, 1974-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1868/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.040481/2023-13

Seropédica-RJ, 26 de junho de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ERICSON RAMOS DE MELLO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em **Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 26/06/2023

(Assinado digitalmente em 27/06/2023 09:01)

BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: ###715#5

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 18:18)

MICHELLE DANIELE DOS SANTOS CLAPP
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: ###088#9

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 17:44)

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.237-##

(Assinado digitalmente em 26/06/2023 16:07)

LUCIO ANDRÉ VIANA DIAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.651-##

(Assinado digitalmente em 27/06/2023 17:05)
SERGIAN VIANNA CARDOZO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.777-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1868**, ano: **2023**,
tipo: **ATA**, data de emissão: **26/06/2023** e o código de verificação: **f697f1b0a8**

Dedico essa conquista a Deus, a minha filha Alice que é a luz da minha vida, meus pais e a minha companheira que me apoiaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde, oportunizado o conhecimento e por me sustentar.

A minha família que sempre esteve presente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Pereira Berto, pela oportunidade dada, por seus ensinamentos, pela paciência, orientação, disponibilidade e amizade no decorrer destes anos.

A Prof^a. Dr^a. Viviane Moreira de Lima por seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes pelo conhecimento compartilhado.

Ao secretário da pós-graduação em Ciências Veterinárias Arthur Santiago Junior pela atenção e disponibilidade durante todo período do curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Ildemar Ferreira do Laboratório de Ornitologia (LABOR), pela orientação no mestrado e por todo auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC) e Laboratório de Atividade Genotóxica de Plantas (LAGEP) que foram fundamentais para a concretização deste estudo.

Aos professores dos Programas de Pós-graduação em Biologia Animal e Ciências Veterinárias que ministraram as aulas e agregaram conhecimento.

Aos membros da banca.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A Pró-reitoria de Assuntos Estudantis (PROAES).

Ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS).

A todos que de alguma forma auxiliaram o estudo e não foram citados aqui.

A equipe do Parque Nacional do Itatiaia, principalmente aos coordenadores de pesquisa Dr. Léo Nascimento (anterior) e Marcelo Souza Motta (atual); o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Pinheiral; O Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais que nos permitiu acessar e usar algumas instalações durante as expedições.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Ericson Ramos de Mello, filho de Ricardo Rosa de Mello e Marialva Ramos Rosa de Mello, nasceu em 18 de maio de 1985, no município do Rio de Janeiro, RJ. Concluiu o Ensino Médio no Colégio Fernando Costa, na cidade de Seropédica/RJ, no ano de 2002. Em agosto de 2003 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de graduação em Zootecnia onde foi bolsista da disciplina Forragicultura e Pastagens. Em março de 2006 ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), através do Consórcio CEDERJ, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Após obter o título de bacharel, em agosto de 2006 e o título de licenciado em agosto de 2010, lecionou as disciplinas de Ciências e Biologia em colégios particulares dos Municípios de Seropédica e Nova Iguaçu no Rio de Janeiro. Em 2011 prestou concurso e foi convocado para ser Zelador Patrimonial, no Município de Seropédica/RJ. No ano seguinte, prestou concurso para UFRRJ, sendo convocado somente no ano de 2014 para o cargo de Assistente em Administração. Em 2016 ingressou no Mestrado em Biologia Animal no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof^o. Dr. Ildemar Ferreira. Foi professor voluntário da disciplina IB-151 Zoologia Geral no ano de 2019. Em sua trajetória profissional na Pró-reitoria de Assuntos Estudantis (PROAES), esteve como Diretor da Divisão de Gestão de Suprimentos da Assistência Estudantil (DIGSAES) até o ano de 2018. Em 2019 assumiu a Direção do Setor de Residência Estudantil (SERE). Em 2020 ingressou no curso de doutorado no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob orientação do professor Dr. Bruno Pereira Berto e coorientação da Professora Dra. Viviane Moreira de Lima. Durante o doutorado também teve a oportunidade de integrar o projeto de pesquisa taxonomia e ecologia de coccídios: identificação morfológica e molecular de espécies em aves silvestres da reserva biológica de Poço das antas, Rio de Janeiro e o projeto de Extensão Coleções Biológicas: Coleção Parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios. Em sua trajetória participou e publicou artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais. Atualmente é Coordenador do Setor de Restaurantes Universitários (SRU), Restaurante Universitário *campus* Seropédica e do projeto de Melhoria da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos fornecidos no Restaurante Universitário da UFRRJ, *campus* Seropédica (BIEXT 2022).

RESUMO

MELLO, Ericson Ramos de. **Identificação molecular de coccídios de aves silvestres: Aplicabilidade de algumas regiões gênicas mitocondriais na diferenciação de espécies e análise filogenética.** 2023. 235p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Os coccídios são protozoários intracelulares obrigatórios que infectam a maioria dos invertebrados, todas as classes dos vertebrados, incluindo os animais domésticos, silvestres e seres humanos. Apresentam ciclos de vida intestinais, embora sejam observados, em algumas espécies, estágios de vida extra-intestinais. São geralmente identificados a partir de amostras fecais. O Brasil apresenta uma diversa avifauna representada atualmente por 1.971 espécies de diferentes ordens, dentre as quais destacam-se os Passeriformes, ordem mais representativa que é frequentemente positiva para diferentes espécies de coccídios parasitas, principalmente dos gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875. O estudo das interações entre esses parasitos e hospedeiros nos permite entender diversos processos ecológicos, evolutivos e comportamentais, incluindo seleção sexual, sucesso reprodutivo, migração, competitividade, dentre outras. Atualmente, existem diversas técnicas e metodologias que podem ser aplicadas para identificação de uma espécie coccidiana além da análise morfológica, desde a confirmação da suscetibilidade do hospedeiro, determinação da densidade parasitária, grau de patogenicidade e identificação de diferenças inter e intra-específicas que fornecem ajustes taxonômicos relevantes. Finalmente, o advento da Biologia Molecular, prática reconhecida e estabelecida, principalmente no estudo de parasitas coccidianos dos animais de produção, oferece informações complementares as de microscopia e métodos imunológicos, por exemplo, pois o sequenciamento do DNA do microrganismo, serve como estudo adicional para a taxonomia e filogenia. Baseando-se nestes fatos, este trabalho, nos capítulos I, II, III e IV teve por objetivos, identificar geneticamente coccídios parasitas de aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro, demonstrando o isolamento de oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres, com posterior extração de DNA a fim de amplificar e sequenciar diferentes regiões gênicas dos genes *cox1*, *cox3* e fragmentos da subunidade pequena e grande do rDNA do DNA mitocondrial, avaliando a aplicabilidade destas novas seqüências na diferenciação de espécies e estudos filogenéticos.

Palavras-chave: biologia molecular, coccídios, COI, 18S, *Isospora*.

ABSTRACT

MELLO, Ericson Ramos de. **Molecular identification of coccidia of wild birds: Applicability of some mitochondrial gene regions in species differentiation and phylogenetic analysis.** 2023. 235p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Coccidia are obligate intracellular protozoa that infect most invertebrates, all classes of vertebrates, including domestic, wild, and human animals. They have intestinal life cycles, although extra-intestinal life stages are observed in some species. They are usually identified from fecal samples. Brazil has a diverse avifauna currently represented by 1.971 species of different orders, among which the Passeriformes stand out, a more representative order that is often positive for different species of parasitic coccidia, mainly of the genera *Isospora* Schneider, 1881 and *Eimeria* Schneider, 1875. The study of the interactions between these parasites and hosts allows us to understand several ecological, evolutionary and behavioral processes, including sexual selection, reproductive success, migration, competitiveness, among others. Currently, there are several techniques and methodologies that can be applied to the identification of a coccidian species beyond morphological analysis, from the confirmation of host susceptibility, determination of parasite density, degree of pathogenicity and identification of inter- and intra-specific differences that provide relevant taxonomic adjustments. Finally, the advent of Molecular Biology, a recognized and established practice, especially in the study of coccidian parasites of production animals, offers complementary information to that of microscopy and immunological methods, for example, because the sequencing of the DNA of the microorganism, serves as an additional study for taxonomy and phylogeny. Based on these facts, this work, in chapters I, II, III and IV, aimed to identify genetically parasitic coccidia of wild birds captured in Atlantic Forest regions of Southeastern Brazil, demonstrating the isolation of coccidia oocysts from fecal samples of wild birds, with subsequent DNA extraction in order to amplify and sequence different gene regions of *cox1*, *cox3* and fragments of the small and large rDNA subunit of mitochondrial DNA genes, evaluating the applicability of these new sequences in species differentiation and phylogenetic studies.

Keywords: molecular biology, coccidia, COIx, 18S, *Isospora*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada no Novo Mundo tiranídeos Tyrannoidea).....	49
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 Dados morfológicos comparativos para oocistos de <i>Isospora</i> spp. registrados de toutinegras (Parulidae).....	62
---	----

Tabela 2 Dados morfológicos comparativos para esporocistos de <i>Isospora</i> spp. registrados de toutinegras (Parulidae).....	63
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada de aves Tyrannida.....	75
--	----

Tabela 2 Morfologia comparativa de <i>Isospora</i> spp. registrada de aves Tyrannida. (continuação).....	76
---	----

CAPÍTULO IV

Tabela 1 <i>Primers</i> e condições de ciclismo para amplificação por PCR de quatro loci do genoma mitocondrial.....	89
---	----

Tabela 2 Comparative morphology of <i>Eimeria</i> spp. recorded from Columbiformes of the World.....	94
---	----

Tabela 3 Análise estatística das comparações médias de oocistos e esporocistos relacionados a caracteres taxonômicos aleatoriamente presentes ou ausentes em oocistos de <i>Eimeria patagioenasae</i>	100
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- Composição do desenho do oocisto esporulado para redescrição de *Isoospora ferox* de papa-moscas, destacando a camada externa da parede oocisto com rugosidade moderada (A) ou mínima (B). Barra de escala: 10 μ l.....47

Figura 2 - Oocistos esporulados de *Isoospora ferox* de fotomicrografias (A, B) e de novas amostras de um papa-moscas, *Myiarchus ferox* (C-G) e de bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurescens* (H-J). Para observação: camadas internas (il) e ásperas (rol) da parede oocisto; micrópila (m); núcleo (n); grânulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 μ l..... 48

Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números dos nós, representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas valores > 40% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....50

CAPÍTULO II

Figura 1 - Desenho do oocisto esporulado de *Isoospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Barra de escala: 10 μ m.....59

Figura 2 - Fotomicrogramas de oocistos esporulados de *Isoospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Para observação: camadas interiores (il) e exteriores lisas (sol) da parede ovócito; grânulo polar (pg); Corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo do esporocisto (sr); corpos refráteis posteriores (prb) e anteriores (arb). Todos para a mesma escala. Barra de escala: 10 μ m.....60

Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança para *Isoospora* spp., estimada a partir das sequências *cox1*. Os números nos nós representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas os valores > 50% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....61

CAPÍTULO III

Figura 1 - Desenho de linha do oocisto esporulado de *Isoospora leptopogoni* de papa-moscas, na América do Sul. Barra de escala: 10 μ m..... 74

Figura 2 - Fotomicrografias de *Isoospora leptopogoni* recuperadas de papa-moscas na América do Sul. Observe a camada interna (il) e externa lisa (sol) da parede do cisto oo, micrópila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refratário (rb), resíduo de esporocisto (sr) e corpo de Stieda (sb) e sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 μ m.....75

Figura 3 - Árvore pelo método de “Neighbor-Joining” estimada a partir das sequências gênicas COI de espécies de *Isoospora*. *Bootstrap* a 1.000 replicações (>40%) para “Neighbor-Joining” (NJ) e “Máxima verossimilhança” (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....75

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Organização do genoma mitocondrial de *Eimeria* spp de aves (baseado no genoma mitocondrial completo de *Eimeria dispersa* disponível no GenBank/BLAST sob o número de acesso KJ608416): Os loci MAVCOXI (posicionados entre ~1.600–2.200 nt) e COIBF1 (posicionados entre ~2.250–2.500 nt) ocupam o gene *cox1*; o locus MARI (posicionado entre ~2.950–3.750 nt) ocupa fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU) e subunidade grande (LSU); e o locus MACOI (posicionado entre ~4.200–4.750 nt) ocupa o fragmento LSU/1 rDNA e o gene *cox3*..... 88

Figura 2 - Desenhos de linhas de oocistos elipsoidais, ovoides e subesferoidais de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*, com presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. Barra de escala: 10 µm.....91

Figura 3 - Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*: oocistos elipsoidais (A–H), ovais (I–N) e subesferoidais (O–R). Observe a camada interna (il), camada externa lisa (sol) e/ou véu externo/camada externa áspera (ov/rol) na parede do oocisto, micrópila lateral (lm), micrópila (m), capa de micrópila (mc), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpos Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala: 10 µm.....92

Figura 4 – Perfil eletroforético de PCR para os locos COIBF1 (A), MACOIII (B, C), MAVCOXI (D) e MARI (E) do genoma mitocondrial de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*, obtido em gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular (m) Escada de DNA Promega 1 kb (250–10.000 pb). Os morfotipos “subesferoidal-c”, “ovoidal-e”, “elipsoidal-i” e “elipsoidal-k” referem-se à extração de DNA de oocistos individuais subesferoidais com micrópila; ovoidal com capa de micrópila e micrópila; elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....93

Figura 5 -Histogramas de diâmetro maior e menor (A) and índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*..... 97

Figura 6 - Histogramas de diâmetro maior e menor (A) and índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*..... 97

Figura 7 - Distribuição dos oocistos subesferoidais (cinza-claro), ovoides (cinza-escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 40). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfotipos): (a) parede do oocisto lisa e sem estruturas morfológicas associadas; b) Com véu exterior/parede áspera; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; f) Com véu exterior/parede áspera e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.....98

Figura 8 - Distribuição dos esporocistos em oocistos subesferoidais (cinza-claro), ovoides (cinza-escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 27). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfotipos): (b) com véu externo/parede rugosa; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila

e micrópila lateral.....99

Figura 9 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (COIBF1) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'ovoidal-e' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; ovulais com capuz polar e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....102

Figura 10 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MACOIII) que cobre parcialmente o gene *cox3* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subesferoidal-c', 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....102

Figura 11 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MAVCOXI) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos elipsoidais com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.....103

Figura 12 - Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MARI) que ocupa fragmentos de pequenas e grandes subunidades rDNA do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. O morfotipo 'elipsoidal-k' refere-se a um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.....103

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO I** - Certificado da proposta intitulada “TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO” protocolada sob CEUA nº: 6606250616.....117
- ANEXO II** - Autorização para atividades com finalidade científica. Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO...119
- ANEXO III** – Licença permanente para coleta de material zoológico. De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).....132
- ANEXO IV** - ORIGINAL PAPER: *Isohora oliveirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the Greenish Schifornis *Schifornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America.....135
- ANEXO V** - ORIGINAL PAPER: Redescription and molecular identification of *Isohora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America.....146
- ANEXO VI** - ORIGINAL PAPER: Distribution, redescription, and molecular identification of *Isohora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America. 155
- ANEXO VII** - ORIGINAL PAPER: *Isohora leptopogoni* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sepia-capped flycatcher *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 (Passeriformes: Rhynchocyclidae) in South America.....164
- ANEXO VIII** - ORIGINAL PAPER: Worldwide Dispersion of Coccidia from Migratory Birds: First Report of *Eimeria bazi* Chauhan et Bhatia, 1970 (Eimeriidae) Outside Ásia from Buff-Necked Ibises *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) (Threskiornithidae) in South America.....174
- ANEXO IX** - ORIGINAL PAPER: Molecular identification of *Isohora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil... 185
- ANEXO X** - ORIGINAL PAPER: *Isohora* spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d’Orbigny; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil.....194
- ANEXO XI** - SHORT COMMUNICATION: Observations on an *Eimeria* sp. (Apicomplexa) from the green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) in Southeastern Brazil: an example of how the ecological aspects of the host can be essential for the identification of its coccidians.....207
- ANEXO XII** - ORIGINAL PAPER: *Isohora basileuterusi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae)

from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America.....212

ANEXO XIII - ORIGINAL PAPER: Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: A case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (Columbiformes) in South America.....218

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

A - adenina
AFLP - (Amplified Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados.
ANOVA - Análise de Variância
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
bp pares de bases
PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
C - citosina
CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health*
CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
CEL - camada exterior lisa
CI - camada interior
CINZ - Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
COI - gene citocromomo mitocondrial C oxidase subunidade 1
CPS - corpo de parastieda
CRA - corpo refrátil anterior
CRP - corpo refrátil posterior
CS - corpo de Stieda
CSS - corpo de substieda
dATP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Adenina
dCTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Citosina
dGTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Guanina
DNA - ácido desoxirribonucleico
dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatos
DM - diâmetro maior do oocisto
dm - diâmetro menor do oocisto
dTTP - desoxinucleotídeos trifosfatos - Timina
DPA - Departamento de Parasitologia Animal
EEcoE - Espaço Ecológico Educativo
EM - diâmetro maior do esporocisto
em - diâmetro menor do esporocisto
EUA - Estados Unidos da América
G - guanina
g - gramas
GenBank - *Genetic Sequence Data Bank*
GP - grânulo polar
ICBS - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFRJ - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
IM - índice morfométrico do oocisto
IME - índice morfométrico do esporocisto
ITS - espaçadores internos transcritos
IV - Instituto de Veterinária
JAVF - *primer forward*
JAVR - *primer reverse*
Kb - quilobase

K₂Cr₂O₇ - dicromato de potássio
LABOR - Laboratório de Ornitologia
LABICOC - Laboratório de Biologia de Coccídios
LAGEP - Laboratório de Atividade Genotóxica de Plantas
LSID - *The Life Science Identifier*
M - micrópila
Mb - megabase
MgCl₂ - cloreto de magnésio
ML - máxima verossimilhança
mtDNA - ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N - núcleo
nested PCR - *nested Polymerase Chain Reaction*
NJ - Neighbor Joining
n.sp. - nova espécie
NTS - espaçadores não transcritos
O - oeste
pb - pares de bases
PBS - *Phosphate-buffered saline*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP
PO - espessura da parede do oocisto
RE - resíduo do esporocisto
RFLP - (Restriction Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RNA - ácido ribonucleico
RO - resíduo do oocisto
S - sul
spp - espécie
rs - resíduo do esporocisto
Sb - Stieda
ssb - substieda
T - timina
U - uracila
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV - radiação ultravioleta
ZooBank - *Official Registry of Zoological Nomenclature*
5.8s - subunidade DNA ribossômico
18s - subunidade RNA, Ribossomal
28s - subunidade RNA, Ribossomal
µl - microlitros
> maior
° Graus
' minutos
" segundos
® marca registrada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
OBJETIVOS	23

CAPÍTULO I

REDESCRIBÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Isospora ferox* BERTO, LUZ, FLAUSINO, FERREIRA; LOPES, 2009 (Eimeriidae) DE PAPA-MOSCAS *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Tyrannoidea) NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO	42
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Coleta de amostras	45
2.2. Análises morfológicas	45
2.3. Análises moleculares	45
2.4. Análises da sequência de DNA	45
3 RESULTADOS	46
3.1 Oocisto esporulado	47
3.2 Esporocisto e Esporozoítos	47
3.3 Observações	47
3.4 Análise filogenética	48
4 DISCUSSÃO	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO II

***Isospora basileuterusi* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PULA-PULA *Basileuterus culicivorus* (DEPPE) (PASSERIFORMES: PARULIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO	55
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1. Coleta de amostras	57
2.2. Análises morfológicas	57
2.3. Geração de dados moleculares	58
2.4 Análise de sequência de DNA	58
3 RESULTADOS	59
3.1 Descrição	60
3.2 Observações	60
3.3 Análise filogenética	61
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÃO	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPÍTULO III

***Isospora leptopogoni* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PAPA-MOSCAS
Leptopogon amaurocephalus, Tschudi, 1846 (PASSERIFORMES:
RHYNCHOCYCLIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO	69
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1. Coletas de amostras	71
2.2. Análises morfológicas	72
2.3. Análises moleculares	72
2.4. Análise de sequência de DNA	72
3 RESULTADOS	73
3.1. Descrição	73
3.2. Análise filogenética	73
4 DISCUSSÃO	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

CAPÍTULO IV

**ABORDAGENS MOLECULARES E ESTATÍSTICAS PARA A DELIMITAÇÃO DE
ESPÉCIES DE EIMERIIDAE: UM CASO DE EXTREMO POLIMORFISMO EM
OOCISTOS EIMERIANOS DE POMBAS-AMARGOSAS *Patagioenas plumbea* Vieillot,
1818 (COLUMBIFORMES) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO	84
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	86
2.1. Coletas de amostras	87
2.2. Análises morfológicas	87
2.3. Análise Estatística	87
2.4. Análise molecular	87
2.5. Análise de sequência de DNA	88
3 RESULTADOS	89
3.1 Prevalência e Descrição	89
3.1.1 Diagnóstico	90
3.1.2 Resumo Taxonômico	91
3.2 Análise morfométrica e estatística	97
3.3 Análise molecular e filogenética	101
4 DISCUSSÃO	104
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
CONCLUSÕES GERAIS	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

INTRODUÇÃO GERAL

Os coccídios são protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao infra-filo Apicomplexa, predominantemente encontrados no trato intestinal dos vertebrados e frequentemente observados em amostras fecais. Entretanto, algumas espécies de coccídios foram relatadas em invertebrados e em outros órgãos além do intestino. Considerados emergentes e oportunistas, apresentam como características principais a presença de oocisto resistente, dotado de uma parede protetora e um complexo apical, composto por microtúbulos subpeliculares, organelas secretórias especializadas e o conóide completo, oco e truncado, este último responsável pela sua adesão e invasão à célula hospedeira e estágios que ocorrem dentro do hospedeiro, chamados estágios endógenos, e estágios exógenos que ocorrem fora do hospedeiro.

Apesar de sua distribuição cosmopolita, certas espécies de coccídios são homoxênicas, nas quais todos os estágios endógenos do parasita ocorrem em um único hospedeiro. Podem operar como “espécies-chave”, apresentando extrema importância para a biodiversidade e conservação, impactando diretamente na manutenção da diversidade em comunidades ecológicas, ecossistemas e em sistemas de produção.

Por consequência, estudos sobre prevalência e densidade de coccídios são extremamente importantes, devido ao fato de que vertebrados, como as aves silvestres, com estresse imunitário em decorrência da ação humana, por características ecológicas como migração, período reprodutivo, e outras características ambientais, serem mais suscetíveis a processos infecciosos e colonização por estes microrganismos.

Dentro do infra-filo Apicomplexa, aproximadamente um terço das espécies existentes pertencem à subordem Eimeriina e dentro da ordem Eimeriida Léger, 1911 formam um grupo heterogêneo, com diferentes complexidades, apresentando classificação em famílias, gêneros e espécies (MASSEY, 2003).

Estudos demonstraram que, dentre os coccídios, o gênero mais encontrado infectando aves é *Eimeria* Schneider, 1875, mas quando se trata de Passeriformes, *Isoospora* Schneider, 1881 é o mais detectado, porém, existem poucos dados disponíveis sobre sua caracterização genética.

As relações interespecíficas de parasitismo são relevantes para o estudo da biologia das espécies da ordem Passeriformes, uma vez que podem abrigar inúmeros parasitos como bernes, piolhos, diversos outros ectoparasitos, nematóides, trematódeos e cestóides, hemoprotozoários e protozoários intestinais.

Em relação ao genótipo, a maioria dos Apicomplexa apresentam dois genomas extracromossômicos presentes na mitocôndria e no apicoplasto ou plastídio (organela exclusiva do Filo Apicomplexa). A mitocôndria possui um genoma constituído de segmentos de DNA lineares composto por unidades repetidas em série de 6 kb. Este genoma caracteriza-se pela presença de três genes, citocromo b (*cit b*), citocromo oxidase subunidade 1 (*cox I*) e citocromo oxidase subunidade 3 (*cox III*), além de sequências fragmentadas de RNA ribossômico. O apicoplasto que é circular, rico em conteúdo adenina e timina possui um genoma de 35 kb composto por 60 genes tRNAs, subunidades maior e menor de rRNA, e genes codificadores de proteínas.

As infecções causadas por coccídios, em aves silvestres estão associadas a diversos fatores, tais como impactos diretos na microbiota, fauna e flora, que indiretamente otimizam e favorecem a transmissão de doenças parasitárias aos animais silvestres. Como na maioria dos tipos de coccidiose, existe um equilíbrio natural entre o parasita e seu hospedeiro, porém, o parasitismo pode levar à morte celular no hospedeiro durante o desenvolvimento do parasita, causando sinais clínicos crônicos e agudos de gravidade variável, podendo surgir quando há um

desequilíbrio associado à baixa imunidade no hospedeiro.

Estudos que envolvam Biologia e Genética Molecular, poderão futuramente elucidar os diferentes mecanismos moleculares até então desconhecidos, possibilitando a proposição de novas estratégias de controle das coccidioses, por exemplo, em animais de produção e um maior conhecimento da ecologia destes microrganismos em animais silvestres, bem como uma melhor e maior diferenciação entre espécies.

Visto isso, o presente estudo, abordará em quatro capítulos a identificação molecular de coccídios de aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro, análise filogenética e a aplicabilidade de algumas regiões gênicas mitocondriais na diferenciação de espécies.

REVISÃO DE LITERATURA

Os Apicomplexa Coccídios

Historicamente, em 19 de outubro de 1674, Antonie Philips van Leeuwenhoek, utilizando-se de um pequeno microscópio, observou minúsculos corpúsculos ovais presentes na bile de coelhos não conseguindo identificá-los adequadamente. A não observação de lesões ou anomalias no fígado e na vesícula biliar desses animais, a baixa quantidade de corpúsculos e o uso de um equipamento rudimentar, podem ter influenciado na descrição e a não publicação da descoberta em suas cartas (DOBELL, 1922; DUSZYNSKI et al., 1999; WAGGONER, 2005; KARAMANOU et al., 2010).

Séculos após, mais precisamente no ano de 1839, o doutor Thomas Gordon Hake, pode ter sido o primeiro a visualizar, com mais riqueza de detalhes, as estruturas observadas por Leeuwenhoek, denominando-as de glóbulos de pús. Porém, somente em 1845, Lieberkühn observou alguns organismos com características semelhantes às gregarinas, denominando-os coccídios (DOBELL, 1922).

Atualmente, a comunidade de protozoologistas reconhece que os microrganismos observados por Leeuwenhoek tratavam-se na verdade de estruturas denominadas oocistos, que Lindemann denominou *Monocystis stiedae*. Em 1875, a espécie foi incluída por Schneider no gênero *Eimeria* (HAMMOND; LONG, 1973 *apud* TEIXEIRA, 2007), tendo a sua nomenclatura alterada para *Eimeria stiedae* (Lindemann, 1865) Kisskalt e Hartmann, 1907 (WENYON, 1926; DUSZYNSKI et al., 1999).

Ao longo do tempo diversos coccídios foram descobertos. Em 1878, Rivolta descreveu algumas espécies parasitando rãs, bezerras e cães (WENYON, 1926). De fato, de acordo com Levine (1985), estes microrganismos podem parasitar a maioria dos invertebrados, todas as classes dos vertebrados, incluindo os animais domésticos e silvestres. Entretanto, algumas espécies são capazes de parasitar também o organismo humano, especificamente as células epiteliais do intestino (WENYON, 1926, SMITH, 1993, LINDSAY et al., 1997, XIAO et al., 2004). Ainda em 1878, Rivolta nomeou a espécie de *Isospora* encontrada em humanos de *Isospora hominis*. Em 1923, Wenyon sugeriu o nome de *Isospora belli* (*belli* do latim: guerra) para as espécies descritas por Woodcock e *I. hominis* para as redescritas por Virchow. (MEIRA; CORRÊA, 1950).

Os coccídios, são microrganismos pertencentes ao infra-filo Apicomplexa, classe Coccidiomorpha, juntamente com as gregarinas, dentro da subclasse Coccidia (DUSZYNSKI, 2011). Formam um grupo diversificado de protozoários intracelulares obrigatórios cuja característica principal é a presença de um complexo apical, composto por microtúbulos subpeliculares, organelas secretórias especializadas, róptrias e micronemas e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide completo, truncado e oco, responsável pela sua adesão e invasão à célula hospedeira (PERIZ et al., 2007; RUGGIERO et al., 2015).

Dentro do filo Apicomplexa, aproximadamente um terço das espécies existentes pertencem à subordem Eimeriorina e dentro da ordem Eimeriida Léger, 1911 formam um grupo heterogêneo, com diferentes complexidades, apresentando classificação em famílias, gêneros e espécies (MASSEY, 2003). Alguns, como os dos gêneros: *Atoxoplasma*, *Caryospora*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* são prejudiciais a saúde de animais silvestres, causando morbidade e mortalidade em alguns casos (FRIEND; FRANSON, 1999; MASSEY, 2003; YABSLEY, 2008; SANTOS et al., 2021).

Após a infecção pela ingestão de oocistos esporulados no ambiente ou através de fômites contaminados observamos o parasitismo intracelular obrigatório no hospedeiro, principal

característica deste grupo, apresentando ciclos biológicos alternados entre reprodução sexuada, fase em que são originados os oocistos e assexuada, originalmente descrita por Eimer, em 1870 (BERTO et al., 2014). De acordo com Belli et al. (2006) e Roberts e Janovy, (2009) a característica morfológica responsável pela definição destes microrganismos é a presença de uma estrutura globular; denominada oocisto, resistente e dotada de uma parede protetora, geralmente identificados em amostras fecais (DOLNIK et al., 2010; BERTO; LUZ, 2016).

Os ciclos de vida intestinais são os mais observados, embora também existam estágios de vida extraintestinais, como na isosporose sistêmica (atoxoplasmosse) em passeriformes, por exemplo (DUSZYNSKI et al., 1999; BERTO et al., 2010; BARTA et al., 2012; BERTO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2023).

O desenvolvimento de um número geneticamente determinado de esporocistos e esporozoítos dentro de cada oocisto ocorrem fora do hospedeiro em condições ambientais favoráveis como: saturação de oxigênio, umidade e temperatura apropriados (DUSZYNSKI, 2011). Em relação ao genótipo, a maioria dos Apicomplexa apresentam dois genomas extracromossômicos presentes na mitocôndria e no apicoplasto ou plastídio (organela exclusiva do Filo Apicomplexa) (WILSON et al., 1997). A mitocôndria possui um genoma constituído de segmentos de DNA lineares composto por unidades repetidas em série de 6 kb. (CHAPMAN; SHIRLEY, 2003). Este genoma caracteriza-se pela presença de três genes, citocromo b (*cit b*), citocromo oxidase subunidade 1 (*cox I*) e citocromo oxidase subunidade 3 (*cox III*), além de sequências fragmentadas de RNA ribossômico (HIKOSAKA et al., 2010). O apicoplasto que é circular, rico em conteúdo adenina e timina possui um genoma de 35 kb composto por 60 genes tRNAs, subunidades maior e menor de rRNA, e genes codificadores de proteínas (CAI et al., 2003; KALANON; MCFADDEN, 2010).

As infecções causadas por coccídios em aves estão associadas a diversos fatores, tais como impactos diretos a fauna, flora e microbiota, que indiretamente otimizam e favorecem a transmissão de doenças parasitárias aos animais silvestres (BERTO; LUZ, 2016). Como na maioria dos tipos de coccidioses, há um equilíbrio natural entre o parasita e seu hospedeiro, porém, o parasitismo pode levar à morte celular no hospedeiro durante o desenvolvimento do parasita, causando sinais clínicos crônicos e agudos de gravidade variável, podendo surgir quando há um desequilíbrio associado à baixa imunidade no hospedeiro (MARQUES et al., 2011).

Para Novaes et al. (2011) estudos que envolvam Biologia e Genética molecular, genoma, expressão gênica, poderão futuramente elucidar os diferentes mecanismos moleculares até então desconhecidos possibilitando a proposição de novas estratégias de controle das coccidioses em animais de produção e na descoberta de novas espécies.

Coccídios e Aves Silvestres

Segundo Hawkins et al. (2003) a região neotropical é conhecida por possuir aproximadamente metade da avifauna mundial, e somente no Brasil foram descritas 1.971 espécies de aves dentre as quais 1.742 são consideradas residentes ou migrantes reprodutores, 126 visitantes sazonais, não reprodutores e 103 errantes. (CBRO, 2021). Segundo Berto (2010), os pássaros da região neotropical são predominantemente endêmicos e na América do Sul ocupam inúmeros nichos ecológicos, assim como em outros continentes, são ocupados por outras aves.

A ordem Passeriformes, mais representativa da classe Aves, inclui mais de 5.000 espécies em todo o mundo, e no Brasil foram descritas aproximadamente 1.119 espécies, o que representa mais de 50% de todas as espécies de aves (BERTO, 2010; CBRO, 2021). Em sua maioria, são classificadas como endêmicas e ocupam, no caso da América do Sul, muitos nichos ecológicos, que, em outros continentes, são habitados por outros grupos de aves (BERTO et al.,

2010).

As aves da ordem Passeriformes estão relacionadas a três grupos principais: Neotropicais, representadas pelas famílias, Dendrocolaptidae, Furnariidae, Formicariidae, Rhinocryptidae, Cotingidae e Pipridae; do Continente americano, representado pelas famílias Tyrannidae, Troglodytidae, Mimidae, Vireonidae, Emberizidae, Parulidae, Coerebidae, Thraupidae, Cardinalidae e Icteridae e do Velho Mundo, Corvidae, Muscicapidae, Turdidae e Sylvidae e Motacillidae (SICK, 1997).

Os Columbiformes são um grupo de aves com ampla distribuição, que provavelmente se originaram nas regiões tropicais do Velho Mundo e migraram recentemente para as Américas (SICK, 1997). Há grande variedade de columbídeos na América do Sul, com ocorrências ao nível do mar, nos Andes, em zonas temperadas, regiões desérticas, bem como em florestas tropicais (MEYER DE SCHAUENSEE, 1982).

Estudos demonstraram que, dentre os coccídios, o gênero mais encontrado infectando aves é *Eimeria* Schneider, 1875, mas quando se trata de Passeriformes, *Isospora* Schneider, 1881 é o mais detectado (PAGE; HADDAD, 1995; BERTO, et al., 2011; KNIGHT et al., 2018), porém, existem poucos dados disponíveis sobre sua caracterização genética (CARRENO; BARTA, 1999; YANG et al., 2021). Estas relações interespecíficas de parasitismo são relevantes para o estudo da biologia das espécies da ordem Passeriformes, uma vez que podem abrigar inúmeros parasitos como bernes, piolhos (BENELLI et al., 2017), diversos outros ectoparasitos, nematóides, trematódeos e cestóides, hemoprotozoários e protozoários intestinais (SOULSBY, 1987).

Recentes estudos como os de Ortúzar-Ferreira et al. (2020) identificaram morfológica e molecularmente *Eimeria columbinae* pelo gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e pelo gene 18S subunidade ribossomal pequena RNA (18S) da uma rolinha-roxa, *Columbina talpacoti* Temminck, 1809, além de promover uma revisão taxonômica detalhada de eimerídeos descritos em Columbiformes de todo o mundo.

O parasitismo de aves migratórias apresenta espécies ubíquas, presentes nos hospedeiros ao longo do ano, que infectam aves apenas no inverno, que infectam aves apenas no verão e de migração, que infectam aves ao longo das rotas migratórias (DOGIEL, 1962). A coccidiose, uma importante doença em Passeriformes, confere sintomas caracterizados por diarreia e desidratação, promotores da redução do ganho de peso provocada pela diminuição da reabsorção intestinal, provocadas pela destruição principalmente de células intestinais do hospedeiro (LONG, 1982), redução da fertilidade, imunossupressão, alterações fisiológicas, problemas nutricionais, infecções concomitantes, dentre outras, que podem predispor a recidivas e surgimento de quadro clínico agudo, podendo levar o animal à óbito (SOULSBY, 1987, FREITAS et al., 2003).

A avaliação das enfermidades em pássaros silvestres é complexa e apesar das frequentes descrições de espécies de *Isospora* spp. parasitando aves, não se observaram sinais clínicos graves (MASSEY, 2003).

Dentre as áreas utilizadas para este estudo, o Parque Nacional de Itatiaia considerado unidade de conservação de proteção integral fazendo parte do Mosaico de Unidades de Conservação da Serra da Mantiqueira, abrigando uma grande biodiversidade de pássaros que representam uma amostragem dos pássaros brasileiros observados na Mata Atlântica (BERTO & LUZ (2016) e a Ilha de Marambaia utilizada para uso militar restrito e também protegida como Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba SEMADS (2001).

Parque Nacional de Itatiaia

O Parque Nacional do Itatiaia (PNI) (22°15'e 22°30'S; 44°30'e 44°45'O) possui 28.156

hectares e está localizado nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e apresenta altitudes diversificadas. Tanto Itatiaia como Itamonte têm a maior parte de seus territórios dentro da unidade de conservação e considerado uma Unidade de Conservação com alto grau de vulnerabilidade (AXIMOFF, 2011; MARONEZI et. al., 2022).

Diversos estudos estão sendo realizados no PNI como os de Oliveira et al. (2021) que redescreveram *Isoospora striata* McQuiston et al. (1997), em dois novos hospedeiros, revelando novas localidades de parasitismo e fornecendo identificações genotípicas preliminares por meio do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) de ambas as espécies hospedeiras. O estudo morfológico e a similaridade de 100% no sequenciamento do gene COI entre amostras de diferentes espécies de dendrocolaptídeos confirmaram a identificação de uma única espécie, que corroborou a identificação de *I. striata* e ratificou a sua ampla distribuição na Região Neotropical.

Isoospora ferox Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 foi redescreta por Ortúzar-Ferreira et al. (2021) a partir de fotomicrografias e de novas amostras de um novo hospedeiro, o bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphureus* Spix. Este estudo forneceu uma caracterização genotípica preliminar, via sequenciamento do gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade 1 (COI).

Maronezi et al. (2022) identificaram três *Isoospora* spp. registradas a partir de amostras fecais de trinca-ferro *Saltator similis* (d'Orbigny; Lafresnaye) no entorno do Parque Nacional do Itatiaia, a saber: *Isoospora saltatori* Berto, Balthazar, Flausino; Lopes, 2008, *Isoospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino; Lopes, 2008 e *Isoospora similisi* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino; Lopes, 2013, todas compatíveis fenotipicamente com suas respectivas descrições originais. Este estudo forneceu uma identificação genotípica preliminar dos isosporídeos através do sequenciamento do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial, que foi adequado para a diferenciação genotípica desses três coccídeos.

Ilha da Marambaia

De acordo com Lorenço et al. (2010) a Ilha da Marambaia situada no litoral da Costa Verde, está localizada na Baía de Sepetiba, no litoral sul do Rio de Janeiro (23°03'39"S, 43°58'48"W), possui 42 km² e uma zona de areia chamada Restinga da Marambaia, que está ligada ao continente no município do Rio de Janeiro (CONDE et al., 2005). Apresenta parte de sua área coberta por remanescentes florestais, semelhantes aos de áreas contínuas ao da região continental, com áreas de manchas de manguezais, dunas e areia costal-arbustiva de restinga sendo considerada uma área de preservação ambiental e de segurança nacional, ocupada pelo Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais (MENEZES; ARAÚJO, 2005).

Lopes (2018) demonstrou em seu estudo que tanto a Ilha da Marambaia, que comporta espécies das famílias Thraupidae, Turdidae e Tyrannidae, Pripidae, Vireonidae, Parulidae e Hirundinidae, e o Parque Nacional do Itatiaia (PNI) onde foi observado as famílias Thraupidae, Thaminophilidae, Dendrocolaptidae, Rhynchocyclidae, Turdidae, Pipridae e Columbidae, apresentando uma grande biodiversidade de Passeriformes, propiciando estudos de ecologia e relações entre parasito/hospedeiro.

Isoospora attilae, do hospedeiro tipo o capitão-de-saíra *Attila rufus* (Vieillot, 1819), foi descrita morfológicamente por Rodrigues et al. (2015) e ao ser comparada com espécies de isosporídeos de hospedeiros semelhantes foi classificada como nova para a ciência.

Andrade et al. (2022) forneceram um estudo morfológico e genotípico de uma espécie de *Eimeria* sp. recuperada de um martim-pescador verde *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) capturado na Ilha da Marambaia. A densidade coccídica, alguns aspectos morfológicos de seus oocistos, os resultados moleculares e, principalmente, o nicho ecológico de *C. americana* no manguezal da Ilha da Marambaia sugerem que esta espécie de coccídio seja um

pseudoparasito. A identificação molecular pelo gene COI reforçou a hipótese de que este *Eimeria* sp. está distante de *Eimeria* spp. das aves, já que as maiores semelhanças genotípicas foram de apenas 93% com *Eimeria* spp. de roedores, primatas, canídeos, morcegos, psitacíformes e galíformes. Assim, a análise filogenética colocou *Eimeria* sp. de *C. americana* separada de um clado com *Eimeria* spp. de mamíferos e aves.

Classificação e diversidade de coccídios

Os coccídios da Família Eimeriidae Minchin, 1903, são representados pelos gêneros *Acrooimeria*, *Atoxoplasma*, *Caryospora*, *Choleoimeria*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Eumonospora*, *Globidium*, *Goussia*, *Isospora*, *Wenyonella* que parasitam todos os grupos de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e invertebrados, infectando diversas células, principalmente no intestino, vesícula biliar, sangue e fígado. (Berto, 2010). Possuem na sua maioria ciclo biológico do tipo monoxênico, em que todas as fases do desenvolvimento parasitário ocorrem no mesmo hospedeiro (ROBERTS; JANOVY, 2009). Segundo Ruggiero et al. (2015) possuem a seguinte classificação:

Super-Reino: Eukaryota Whittaker; Margulis, 1978

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Sub-Reino: Harosa Cavalier-Smith, 2010

Infra-Reino: Halvaria Cavalier-Smith, 2010

Super-Filo: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Sub-Filo: Myzozoa Cavalier-Smith; Chao, 2004

Infra-Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Super-Classe: Sporozoa Leuckart, 1879

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Ordem: Eimeriida Léger, 1911

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

A Ordem Eimeriida é subdividida em Adeleorina Léger, 1911 e Eimeriorina. A Subordem Eimeriorina compreende todos coccídios superiores que apresentam gametogonia. Os gêneros de Eimeriorina taxonomicamente foram separados de acordo com a proporção de esporocistos e esporozoítos por oocisto, no entanto, atualmente, outras características incluindo dados moleculares, são utilizadas para diferenciação genérica (BERTO et al., 2014). Dentre estas características, a presença de corpo de Stieda, parastieda e subStieda as quais são estruturas de excistamento do esporocisto, podem ser componentes básicos da Família Eimeriidae. Os únicos gêneros classificados como Eimeriidae são: *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* e *Caryospora* em aves e répteis (JIRKU et al., 2002), porém outros ainda são especificamente incluídos nessa família.

Este estudo terá uma maior abordagem dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* Schneider, 1881 visto que estão presentes em várias famílias de Passeriformes no Brasil.

Gênero *Eimeria* Schneider, 1875

Segundo Ehret et al. (2017) e Duszynski (2011) o gênero *Eimeria* é o maior e mais biodiverso do filo Apicomplexa com mais de 1.800 espécies descritas, parasita invertebrados e vertebrados, apresenta seus oocistos esporulados contendo quatro esporocistos, cada um com

dois esporozoítos e é considerado o táxon eucariótico mais especioso (YANG et al., 2014; ARISUE; HASHIMOTO, 2015).

As espécies de Eimeriidae são principalmente intestinais, embora algumas se desenvolvam em tecidos, incluindo o fígado, baço, pulmões, rins, túbulos renais, vesícula biliar, ovário, útero dentre outros (ENTZEROTH et al., 1981; ROSALES; MASCARO, 1999). A maioria das espécies do gênero *Eimeria* são parasitas intracelulares monoxênicos (LONG; JOYNER, 1984; MARQUARDT, 1981) e apresentam ciclos de vida similares, com fases parasitárias e ambientais (oocistos), geralmente hospedeiro-específicas e se desenvolvem nas células da mucosa intestinal (DAUGSCHIES E NAJDROWSKI, 2005).

Segundo Ling et al. (2007) o genoma de *Eimeria* spp. possui 55 milhões de pares de bases, com 53% de conteúdo Guanina e Citosina e está organizado em 14 cromossomos, que variam de tamanho entre 1 a mais de 7 Mpb (SHIRLEY, 1994; 2000).

Estes organismos também apresentam dois genomas extracromossômicos: o genoma mitocondrial que é constituído de segmentos de DNA lineares contendo unidades repetitivas de 6kb (CHAPMAN; SHIRLEY, 2003) e o genoma do apicoplasto (organela exclusiva dos organismos do Filo Apicomplexa) que é circular, rico em conteúdo AT e em *Eimeria tenella*, contém cerca de 35 kb (CAI et al., 2003).

Gênero *Isospora* Schneider, 1881

Centenas de *Isospora* spp. foram descritas a partir de aves Passeriformes, das famílias Dendrocolaptidae, Furnariidae, Thamnophilidae; parvordem Furnariida, infraordem Tyranni; Cotingidae e Tyrannidae do parvordem Tyrannida, infraordem Tyranni; Corvidae e Meliphagidae do parvordem Corvida, infraordem Passeri; Cardinalidae, Coerebidae, Emberizidae, Estrildidae, Fringillidae, Hirundinidae, Icteridae, Parulidae, Passeridae, Sturnidae, Thraupidae, Timaliidae, Turdidae e Zosteropidae parvordem Passerida, infraordem Passeri. (BERTO, et al. 2011).

Segundo Pellérdy (1974) e (BARTA et al., 2015) os isosporídeos apresentam oocistos com dois esporocistos, cada um possuindo um corpo Stieda e quatro esporozoítos. Para Pellérdy (1974) mais de 90% de todos os coccídios descritos que infectam aves silvestres pertencem ao gênero *Isospora*.

Dados moleculares de espécies aviárias de *Isospora* são escassos e, quando disponíveis, são geralmente sequências nucleares de subunidades pequenas de rDNA (CARRENO & BARTA 1999). Schrenzel et al. (2005) também obtiveram sequências mt COI curtas em um dos primeiros usos de sequências mt em estudos moleculares desses coccídios.

Para Schrenzel et al. (2005) a genotipagem baseada em sequência de espécies de *Isospora* tem como alvo os locus genéticos 18S rDNA, ITS-1 e ITS-2, entre outros, muito embora seja útil para inferir relacionamentos evolutivos mais profundos, a divergência genética é limitada em sequências nucleares de 18S rDNA para permitir uma diferenciação confiável de coccídios em nível de espécie (OGEDENGBE et al., 2011; EL-SHERRY et al. (2013).

Hafeez (2014) relatou que a identificação específica com base na microscopia é praticamente impossível pois algumas espécies de *Isospora* possuem oocistos morfológicamente indistinguíveis. Hafeez e Barta (2017) identificaram as sequências completas do genoma mitocondrial de *Isospora greineri* (6223bp) e *Isospora superbusi* (6217bp) que causou coccidiose sistêmica em *Lamprotornis superbis*; Aves: Sturnidae, mantidos em cativeiro no Zoológico de Toronto Canadá. O genoma mitocondrial tinha três genes codificadores de proteínas (COI, COIII e *CitB*), bem como 18 fragmentos LSU e 14 SSU rDNA, mas nenhuma região codificando tRNAs e a organização do genoma foi idêntica àquela observada em uma variedade de genomas mt de eimerídeos (OGEDENGBE et al. 2014).

Sequências mitocondriais do citocromo c oxidase subunidade I (COI) (“DNA barcoding”) são consideradas extremamente adequadas para delimitação de espécies baseadas em sequência de espécies de *Isospora*, bem como outros coccídios. (SCHRENZEL et al., 2005; OGEDENGBE et al., 2011; EL-SHERRY et al., 2013).

Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Eimeria* e *Isospora* apresentam um ciclo de vida monoxênico (isto é, com um único hospedeiro) que se inicia quando um hospedeiro susceptível ingere um oocisto esporulado (MCDOUGALD; REID, 1995). A principal característica do ciclo de *Eimeria* spp. é a existência de um ciclo exógeno: esporulação do oocisto em ambiente apropriado e um ciclo endógeno: multiplicação do parasita no trato digestivo do animal e formação do zigoto (ESCOBAR GRIMALDI et al., 2010).

O ciclo do parasito ocorre através da ingestão dos oocistos esporulados viáveis do parasito provenientes de um local contaminado, por parte das aves. A ação mecânica da ingestão, a presença de proteases e sais biliares são responsáveis pela quebra da membrana celular do oocisto e liberação dos esporocistos. (WOODMANSEE, 1987).

A passagem pelo trato intestinal, mais especificamente a interação com o suco pancreático, excita o esporocisto que libera vários esporozoítos, estes movem-se em direção ao tecido epitelial da porção duodenal do intestino, através de movimentos ondulatórios e com o auxílio de um suco proteico secretado pelo esporocisto.

Dentro do tecido, os esporozoítos crescem alimentando-se das células hospedeiras, esta fase é denominada trofozoíto e causa dano gradual à célula do epitélio intestinal, proporcional ao crescimento do parasito. Em seu tamanho máximo (10 a 12 µm), o parasito causa a atrofia da célula e induz a replicação da mesma de forma a aumentar o número de parasitos (CHAPMAN, 2014).

A produção de gametas se dá pela diferenciação dos esquizontes maturados de acordo com o grau de nutrientes acumulado por eles. A diferenciação dos macrogametócitos (que dão origem a um único gameta feminino) ocorre devido ao grande suporte nutricional existente. Os microgametócitos (que dão origem a vários gametas masculinos), possuem menor aporte nutricional. Os macrogametócitos se depositam dentro do tecido epitelial do intestino até a completa maturação/desenvolvimento, quando o tecido é rompido o macrogameta é deslocado de forma a fazer contato com a parede interna do intestino, ainda preso nela. Nessa fase os macrogametas são atacados pelos microgametas que rompem a membrana do microgametócito e se deslocam, através de “movimentos chicote” e com o auxílio do flagelo, em direção ao gameta feminino para realizar a fecundação. Após a fecundação, há a formação do zigoto que depois da fecundação, na maioria dos casos, assume a forma oval (tamanho e forma dos oocistos possuem inúmeras variações) e adquire uma membrana celular protetora, sendo chamado de oocisto. Eventualmente, os oocistos se desprendem da parede intestinal e ficam livres para serem secretados junto às fezes do animal. Em condições favoráveis, de temperatura, calor e umidade, o oocisto pode ser esporulado; processo que consiste na divisão do núcleo do oocisto e formação de esporocistos individualizados pela massa celular. O oocisto esporulado, quando ingerido por outro animal, sofrerá excitação pelo suco pancreático, liberação dos esporozoítos e início de uma nova infecção (CHAPMAN, 2014).

Identificação de espécies coccídias

É notório que espécie é uma unidade comparativa necessária nos campos da biologia, sistemática, anatomia, etologia, desenvolvimento, ecologia, evolução, genética, filogenia,

biologia molecular, paleontologia, fisiologia, dentre outras áreas. Isto posto, muitos conceitos de espécie, incluindo o biológico, morfológico, por isolamento reprodutivo, dentre outros foram propostos (DE QUEIROZ, 2005, 2007). Na prática, os taxonomistas caracterizam e consequentemente classificam as entidades biológicas, tornando-as tangíveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome, construído de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (DE QUEIROZ, 2007).

A atribuição de um nome constitui a elaboração de uma hipótese, segundo a qual um determinado conjunto de caracteres, principalmente morfológicos, inferem uma identificação padronizada de uma espécie, com características biológicas distintas, história evolutiva independente de outras entidades biológicas semelhantes. (LIPSCOMB et. al., 2003).

O modelo tradicional de descrição e identificação de espécies é baseado em características morfológicas, pelo fato de que foram os caracteres perceptíveis e erigidos, disponíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Deste modo, o conhecimento sobre a diversidade biológica é fundamental para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a atividade de nomeá-las é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e a tudo que está relacionado aos organismos (SAVAGE, 1995).

Segundo Ferreira et al. (2009), o primeiro sistema de classificação biológica, o qual consistia na separação dos organismos de acordo com suas semelhanças e diferenças, consistindo dessa forma num sistema de classificação artificial é atribuído ao filósofo grego Aristóteles (384 a.C. – 322 a.C.). O sistema de classificação atual, binomial, somente foi proposto em 1735 por Carl Linne, (1707-1778) com a publicação do seu livro “*Systema naturae*” (LINNAEUS, 1758).

Contudo, embora houvesse regras mais criteriosas para a classificação dos organismos, os mesmos eram agrupados de acordo com suas semelhanças e diferenças, consistindo assim, também, num sistema de classificação artificial. Uma maior organização ocorreu somente em 1950, com o estabelecimento da sistemática filogenética por Willi Hennig e a consolidação da escola cladista, a qual se baseia, não somente nas semelhanças e diferenças entre os organismos para a classificação dos mesmos, mas também na atribuição de ancestrais comuns às espécies. Assim, o sistema de classificação passou a procurar grupos naturais de organismos. (PAPAVERO, 1971).

A identificação dos coccídios é realizada basicamente, através da observação dos oocistos esporulados (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002). O diagnóstico é baseado na avaliação macroscópica descrita inicialmente por Johnson e Reid (1970), através da observação e das lesões intestinais: duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon, posteriormente classificadas em graus de lesão. Porém, outros métodos laboratoriais podem ser utilizados para melhor acurácia, como o exame histopatológico, parasitológico e molecular.

O diagnóstico de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*, por exemplo, é realizado principalmente pela pesquisa de oocistos em esfregaços fecais corados. No caso de *Cryptosporidium* pode também ser realizado testes pela detecção de coproantígenos por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou através da reação em cadeia da polimerase (PCR) na qual é realizada a amplificação do DNA. Além disso, a análise do polimorfismo genético de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) permite um melhor entendimento da dinâmica da transmissão podendo ser utilizada na caracterização das espécies de *Cryptosporidium*. (GARCIA, 2010).

Aspectos morfo-biológicos

Os oocistos de coccídios são estruturas extremamente resistentes, de aspecto circular, providos por uma parede de bicamadas, protetiva, e de uma membrana externa não visível em

oocistos maduros, com textura variando de lisa a rugosa (BELLI et al., 2006, CDC, 2019). Além de sua morfologia básica ser comum a todos coccídios, sendo também responsáveis por suas definições, oferecem resistência a danos mecânicos e químicos que permite a sobrevivência dos parasitas e permanência da capacidade infectante, por períodos prolongados. (LEVINE, 1985; SOULSBY, 1987, BELLI et al., 2006; BERTO, 2010). São frequentemente isolados das fezes ou urina de hospedeiros, tais como em diversas espécies de aves, como observado neste estudo (BERTO, 2010).

Os oocistos do gênero *Isospora* são denominados dispóricos tetrazóicos por conter dois esporocistos com quatro esporozoítos em cada um e os do gênero *Eimeria*, tetraspóricos dizóicos por apresentarem quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (LEVINE, 1985).

A observação das características apresentadas pela parede bicamada do oocisto é fundamental na diferenciação e identificação das espécies de *Eimeria*, que apresentam paredes, com micrópila, espículas, rugas, e capuz polar por exemplo e de *Isospora* que apresentam paredes uniformes (CASAS et al., 1995). Apesar de não ser uma característica frequente em *Isospora* spp, algumas espécies de coccídios apresentam em sua camada exterior, micrópila e um capuz polar (BERTO et al., 2009b).

As características da parede do oocisto são utilizadas na diferenciação e identificação das espécies de *Eimeria*, levando em consideração que a maioria dos eimerídeos apresentam paredes distinguíveis, com espículas, rugas, micrópila, capuz polar e/ou outras características. Em contrapartida, no gênero *Isospora* as paredes tendem a ser mais uniformes, e por isso, faz-se necessária à observação de outras características para que as espécies possam ser diferenciadas (CASAS et al., 1995). Em consequência e função dos esporocistos de *Isospora* apresentarem corpos de Stieda e substieda que seguem um padrão em cada espécie; esta característica é utilizada na diferenciação e identificação. No gênero *Eimeria* esta estrutura é menos comum (GRULET et al., 1982; BERTO et al., 2009b; 2009c; 2009d; 2009e).

Duszynski e Wilber (1997) descreveram como característica morfológica básica dos oocistos dos gêneros *Eimeria* e *Isospora*, diâmetros maior e menor do oocisto e esporocisto, assim como seus respectivos índices morfométricos, que correspondem a razão entre os diâmetros maior sobre menor, textura, colorações, projeções e camadas da parede do oocisto, presença em sua estrutura interna de esporocistos contendo esporozoítos (forma infectante), presença ou ausência de micrópila, capuz polar, resíduo e grânulo polar no oocisto, presença ou ausência de esporopódios, membranas aderentes, suturas, resíduo e corpos de Stieda, substieda e parastieda no esporocisto e presença ou ausência de corpo refrátil e núcleo no esporozoíto. Apesar de não ser uma característica frequente em *Isospora* spp, algumas espécies de coccídios apresenta em sua camada exterior, micrópila e um capuz polar (BERTO et al., 2009b)

Internamente, o oocisto de *Isospora* spp. apresenta dois esporocistos; entre eles pode ocorrer uma massa homogênea chamada de resíduo do oocisto, ou um granulo polar (BERTO et al., 2014). Os esporocistos possuem estruturas em seu ápice chamadas de corpo de Stieda e substieda. Estas estruturas são utilizadas para a identificação e diferenciação morfológica do gênero *Isospora* e demais gêneros de Eimeriidae.

Existem inúmeros formatos e tipos de Stieda e substieda e algumas redescições de espécie tem sido fundamentada com base nessas estruturas. Berto et al. (2014) sugeriram através do desenho do corpo de Stieda e substieda, termos específicos a serem usados para descrição morfológica [adaptado de Grulet et al. (1982), Berto et al. (2009a-c, e, 2010b, 2011b, c, 2013a, b), Balthazar et al. (2009b), Pereira et al. (2010) e Coelho et al. (2011a, b, 2013)], com as seguintes classificações para corpo de Stieda: Achatado, Arredondado, em forma de botão, em forma de botão e bolha, em forma de mamilo, em forma mamilo a meia-lua, em forma mamilo para triangular, em forma de meia lua, triangular e triangular em losango e para corpo de substieda: Ausente, largo, arredondado, arredondado irregular, retangular, trapezoidal, trapezoidal com base irregular, cônico e compartimentado.

Dentro do esporocisto, grânulos difusos ou compactos, denominado “resíduo de esporocisto”, podem ser observados, apresentando variações em quantidade e forma, de acordo com a espécie (BERTO et al., 2014). Os esporocistos de *Isospora* spp., possuem 4 esporozoítos em seu interior, estes esporozoítos, forma infectante, possuem corpos refráteis únicos ou em pares, classificados como anteriores e posteriores. Mais ao centro, no esporozoíto encontra-se o núcleo, menor em tamanho que os corpos refráteis. Os esporozoítos podem apresentar estrias em extremidade anterior (BERTO et al., 2014).

Berto et al. (2014) relacionaram a proporção de esporocistos e esporozoítos de oocistos de coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida) recuperados de amostras fecais da seguinte forma: *Cryptosporidium* não possui esporocisto e possui 4 esporozoítos; *Tyzzeria* e *Pfeifferinella* não possuem esporocisto e apresentam 8 esporozoítos; *Caryospora* apresenta 1 esporocisto e 8 esporozoítos; *Cyclospora* apresenta 2 esporocistos e 2 esporozoítos; *Isospora*, *Hyaloklossia*, *Nephroisopora*, *Toxoplasma*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Neospora*, *Hammondia* e *Besnoitia* apresentam 2 esporocistos e 4 esporozoítos; *Eimeria*, *Choleoeimeria*, *Acroeimeria* e *Calyptospora* apresentam 4 esporocistos e 2 esporozoítos; *Barroussia*, *Adelea*, *Adelina*, *Pseudoklossia* e *Goussia* apresentam variados a muitos esporocistos e 2 esporozoítos; *Klossia* apresenta variados a muitos esporocistos e 4 esporozoítos; *Klossiella* e *Aggregata* apresentam variados a muitos esporocistos e apresenta variados a muitos esporozoítos.

Berto et al. (2010b) elaboraram uma chave de identificação das espécies do gênero *Isospora* spp. parasitas de Passeriformes na América do Sul utilizando como base apenas as características morfológicas e morfométricas dos oocistos.

Outras abordagens experimentais, como a quantificação de oocistos por grama de fezes (OoPG), especificidade do hospedeiro, aspectos do ciclo de vida, locais de infecção, patogenicidade e antigenicidade e sequenciamento de nucleotídeos, complementados pela caracterização morfológica tradicional de coccídios, proporcionam melhorias no diagnóstico e identificação de espécies. (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2011^a).

Complementando a microscopia, outros métodos parasitológicos de identificação diretos como a safranina azul de metileno (BAXBY; BLUNDELL; HART, 1984), coloração por Kinyoun (MA; SOAVE, 1983) Ziehl-Neelsen modificado, muito usada em função do tamanho do oocisto na rotina laboratorial (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT et al., 1990) coloração negativa de verde-malaquita (ELLIOT, MORGAN e THOMPSON, 1999), coloração Hematoxilina Férrica de Faust, para visualização morfológica dos protozoários, Giemsa, Auramina (PACHECO, 2013), mas são considerados de baixa sensibilidade e especificidade, principalmente quando o número de oocistos na amostra são diminutos (MORGAN et al., 1998).

Diversos testes baseados em princípios imunológicos foram desenvolvidos para análise de protozoários em amostras fecais. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) está entre os testes sorológicos corriqueiramente utilizados em pesquisa médica para identificação de anticorpos de parasitos em casos isolados ou em estudos epidemiológicos. Outros testes sorológicos incluem a Aglutinação Direta Modificada (MAD) e ELISA.

O ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) oferece uma alternativa diagnóstica em substituição à microscopia, pois independe da identificação morfológica de oocistos por detectarem antígenos do parasito em questão. (DUBEY, 2001; THOMPSON et al., 2003; SOUZA, 2005; BRAGA et al., 2011; DUBEY et al., 2011; ALANAZI; ALYOUSIF, 2011).

A Imunofluorescência Direta utiliza um anticorpo monoclonal contra proteínas específicas presentes na parede do oocisto do parasito. Esses testes apresentam vantagens, pois são bastante sensíveis e específicos, de fácil execução e podem permitir o processamento de mais de uma amostra em curto período de tempo (GARCIA; SHIMIZU, 1997).

Alguns testes imunoenzimáticos fazem detecção da infecção em animais na fase pré-

patente, onde ainda não estão eliminando oocistos nas fezes (SMITH; NICHOLS, 2010).

Métodos sorológicos mais trabalhosos e que requerem tempo para execução da interpretação dos resultados como *Western Blot*, ou ensaio de imunotransferência, detectam anticorpos, apresentando sensibilidade e especificidade na reação com o antígeno do parasita através de uma membrana de poliacrilamida. (DUBEY et al., 2015).

O conhecimento sobre coccídios e sobre os demais protozoários, através da parasitologia diagnóstica, avançou nos últimos anos, graças ao desenvolvimento da biologia molecular, iniciado após a descoberta do DNA. A detecção e taxonomia dos coccídios, através da aplicação de métodos morfológicos e morfométricos, foram complementadas pelos métodos moleculares, visando superar algumas limitações encontradas nos métodos microscópicos convencionais (CARVALHO-ALMEIDA, 2004), particularmente no que diz respeito aos parasitas coccidianos dos animais de produção (CARVALHO et al., 2011; CHAPMAN et al., 2013).

Romper a robusta parede do oocisto para liberar DNA é um desafio para os estudos de biologia molecular, justamente pela presença de duas ou mais camadas espessas e resistentes (HAMMOND; LONG 1973; DUSZYNSKI et al., 1981; BELLI et al., 2006). Segundo Zhao et al., (2001) a camada interna contém aproximadamente 70% de proteína. Tang et al. (2017) relataram que diversos métodos utilizados para a lise da parede celular, como congelamento e descongelamento repetidamente (JINNEMAN et al., 1998), incubação com fenol quente (STUCKI et al., 1993), sonicação, etanol, amônia, ou lisozimas não foram suficientemente eficazes para o rompimento da parede do oocisto.

A ruptura adequada geralmente é alcançada apenas quando se usam forças mecânicas, como por exemplo: a centrifugação com esferas de vidro (DUBEY et al., 1970, SHIRLEY 1995, SCHARES et. al., 2005; MACPHERSON; GAJADHAR, 1993; FERNANDEZ et al., 2003) ou trituração em mini pilão (HAUG et al., 2007). Esses métodos são mais adequados para amostras contaminadas com grande número de oocistos, como as fezes. Porém, em casos de infecção subclínica com pequeno número de oocistos ($< 10^3$), as paredes do oocisto não se quebram uniforme e completamente, reduzindo muito o rendimento do DNA (ZHAO et al., 2001).

Kaya et al. (2007) demonstraram que o método envolvendo hipoclorito de sódio e choque osmótico, com solução saturada de sal, propiciou a lise da parede do oocisto, minimizando a perda de DNA durante o procedimento de extração. Este método superou as desvantagens dos métodos existentes de extração de DNA baseados em procedimentos de moagem de esferas de vidro e excitação de esporozoítos. Tang et. al. (2017) compararam quatro metodologias de extração de DNA diferentes, com resultados obtidos através da utilização da técnica a qual denominaram otimizada, com diferentes tratamentos contendo hipoclorito de sódio e soluções saturadas de cloreto de sódio, por tempos determinados de incubação (0,5, 1, 1,5 e 2,0 h) e concluíram que através de um método de lise de oocistos simples, sensível e eficaz para extração de DNA, utilizando-se de um pequeno número de oocistos de coccídios, as vantagens oferecidas incluem perda mínima de DNA, menos riscos de contaminação e alto rendimento de amostras, facilitando assim o uso de técnicas de identificação molecular e o desenvolvimento de conjuntos de dados epidemiológicos valiosos, com grande importância para a prevenção e manejo da coccidiose.

No trabalho de Yang et al. (2014), o DNA total foi extraído de 200 mg de cada amostra fecal usando *Power Soil DNA Kit* (MolBio, Carlsbad, Califórnia) com algumas modificações.

Alguns Kits comerciais são constantemente utilizados na extração de DNA de coccídios, tais como: “Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen, São Paulo, Brasil), (Ortúzar-Ferreira, et al., 2021; Melo et al., 2022, Mello et al., 2022), Wizard “Genomic DNA Purification Kit” (Promega, USA), DNazol Reagent, (Invitrogen, USA), PureLink® Genomic DNA Mini Kits, dentre outros. (REGINATO et al, 2020).

Reginato et al. (2020) avaliaram seis protocolos para extração de DNA de *Eimeria* spp. em amostras de bovinos e ovinos em seis protocolos de extração de DNA: kit comercial, kit

comercial com modificação, DNazol, brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB), esferas de vidro e kit comercial para amostras fecais e concluíram que todos os protocolos de extração testados promoveram a liberação de DNA de oocistos, porém CTAB mostrou-se melhor na extração de DNA devendo ser considerado como método de extração de DNA em estudos moleculares envolvendo oocistos de *Eimeria* sp. de ovinos e bovinos.

Biologia Molecular

A Biologia Molecular investiga e estuda o genoma dos organismos, e o conjunto de suas informações genéticas (CASLEY, 1992). Dada algumas limitações na detecção de espécies a partir dos métodos diretos e imunológicos, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, fornece informações valiosas em complemento das oferecidas pela microscopia ou técnicas imunológicas (SOLFERINI; SELIVON, 2012; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012).

Berto et al. (2014) realizaram uma revisão de literatura que abordou detecção, sistemática e taxonomia dos coccídios revelando que a aplicação de métodos moleculares aumentou consideravelmente desde meados dos anos 90 e agora é uma prática firmemente estabelecida, principalmente no que diz respeito aos parasitas coccídios de animais de produção e silvestres (CARVALHO et al., 2011; CHAPMAN et al., 2013).

Os caracteres morfológicos e comportamentais embasaram por muitos anos, estudos de taxonomia e sistemática pelo fato de serem as principais informações visíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Entretanto, levando em consideração que fatores bióticos e abióticos influenciam a relação do genótipo com o fenótipo, muitas espécies podem ter sido erroneamente identificadas ao longo do tempo. A identificação molecular, (ou taxonomia molecular), por sua vez, tem sido eficiente em solucionar os problemas enfrentados pela taxonomia tradicional, como: separação de espécies crípticas, identificação de espécies com grande plasticidade fenotípica, identificação de estágios do desenvolvimento (HEBERT et al. 2003).

Com o constante desenvolvimento tecnológico e a evolução gradual de novos métodos de estudos, o conhecimento da biodiversidade atingiu maiores proporções. Há aproximadamente 50 anos, as sequências de nucleotídeos do DNA ribossômico foram utilizadas para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (WOESE; FOX, 1977) e as pesquisas em DNA mitocondrial dominaram a sistemática molecular no final da década de 70 e início da década de 80 (AVISE, 1994) e desde o final da década de 90, sequências de DNA vêm sendo utilizadas como marcadores para inferir as relações evolutivas entre as diversas espécies biológicas (WOESE; FOX, 1977), em abordagens taxonômicas e estudos de biodiversidade (TAUTZ et al., 2002).

De acordo com Jex et al. (2008) as técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, e fornecem informações valiosas além das oferecidas pela microscopia ou técnicas imunológicas (PACHECO, 2013). Entretanto, ainda apresentam custo elevado quando comparada às outras técnicas de detecção de oocistos e por isso, esses métodos não têm sido rotineiramente utilizados em laboratórios de diagnóstico (MEIRELES, 2010).

Atualmente, diversos marcadores moleculares estão sendo utilizados para o auxílio diagnóstico na diferenciação e identificação de diferentes espécies de protozoários, como: utilização de isozimas (GUSMÃO et al., 2000), fragmentos obtidos por enzimas de restrição (RFLP) (MOYSÉS; ALMEIDA-TOLEDO, 2002), DNA arrays (HAJIBABAEI et al., 2007; LOYFER, 2023), SNPs (single-nucleotide polymorphism) (SHAFFER; THONSOM, 2007; LASERNA-MENDIETA, 2023), PCR-Multiplex (NAMDAR, 2023), sequências de DNA dos mais variados genes (POOK & MCEWING, 2005; LEMER et al., 2007; CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2022), dentre outros.

Principais métodos moleculares de identificação e caracterização

Segundo Oliveira (2011) a identificação das espécies de *Eimeria* e *Isospora* tem sido classicamente feita utilizando-se como parâmetros características morfológicas e morfométricas, a espécie do hospedeiro, o local da infecção, aspecto das lesões, período de pré-patência, período mínimo de esporulação, morfologia do oocisto esporulado, proteção cruzada, entre outros. Devido a polimorfismos e especificidade desconhecida do hospedeiro, a biologia molecular veio para ajudar nessa caracterização, delimitando com maior precisão as espécies. (GRULET et al., 1982; LEVINE, 1982).

Perante a limitação na detecção de espécies a partir dos métodos diretos e imunológicos, rotineiramente utilizados, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento dos ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficaz para a diferenciação de espécies (JEX et al., 2008).

As técnicas moleculares possuem ampla aplicação na área da parasitologia, no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, genética de populações, taxonomia, evolução biológica, epidemiologia e demais interações, melhorando nosso entendimento sobre a relação do parasito-hospedeiro (JEX et al., 2008; FAYER et al., 2010).

A principal metodologia molecular empregada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada como amplificadora de sequências de DNA específicas de espécies para diagnóstico (OGEDENGBE et al., 2011a), de marcadores moleculares de nível de gênero ou família; incluindo o *locus* 18S rDNA nuclear (MORRISON et al., 2004), de regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) (MOTRIUK-SMITH et al., 2011) ou o gene (*cox-1*, COI), que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase mitocondrial (OGEDENGBE et al., 2011b).

PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma técnica revolucionária de biologia molecular capaz de amplificar uma sequência específica de ácidos nucleicos e aumentar exponencialmente o número de cópias para detecção, envolvendo a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (TSUJI et al., 1997).

Idealizada e desenvolvida pelo bioquímico estadunidense Kary Banks Mullis em 1984, difundida e com o passar dos anos mais acessível, consiste basicamente na amplificação de um alvo molecular específico (fragmento de DNA ou RNA) por meio de uma reação química composta por diferentes etapas.

De acordo com Morgan et al. (2009) a PCR proporciona sensibilidade e velocidade para a análise de amostras de DNA, e a abordagem tem a capacidade de quantificar o DNA.

Para que a reação ocorra existe a necessidade da presença de quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), com acontecimentos como: a desnaturação, com abertura da fita de DNA alvo (dupla fita); o anelamento, na qual os iniciadores ou *primers* interagem com sua sequência complementar, etapa que garante a especificidade ao processo e a extensão enzimática, quando um par de oligonucleotídeos, utilizados como iniciadores, (funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada *primer*) e que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Todos os *primers* são elaborados e sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas da região alvo. A terceira etapa da reação consiste na replicação do alvo por meio da enzima DNA polimerase. Essas três etapas ocorrem em temperaturas diferentes e sendo repetidas por pelo menos 30 vezes, gerando uma amplificação exponencial (TEDLA, 2019).

Em cada ciclo da PCR, ocorre a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; o anelamento dos *primers* as regiões alvo, ocorre com uma queda da temperatura para aproximadamente 35°C a 60°C; posteriormente a temperatura volta a aumentar, para 72°C, proporcionando a extensão da fita a partir da enzima DNA polimerase em cada terminal 3' dos *primers*. A extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo (REGITANO, 2001).

O nested-PCR é realizado a fim de aumentar a especificidade/sensibilidade da reação, no qual o produto amplificado (*amplicon*) na primeira PCR é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do seguimento já amplificado. O segundo par de iniciadores usado sempre amplifica uma sequência menor que o primeiro par, tornando a reação de PCR mais específica e sensível (GRECA, 2010; MIGUEL-OTEO et al., 2017).

A PCR em tempo real ou qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa) é uma variação da PCR tradicional que possibilita a identificação do DNA alvo em menor tempo, de forma quantificável, e sem a necessidade do procedimento de eletroforese. Dessa forma a qPCR possibilita a quantificação da parasitemia, o que não pode ser alcançado por outras abordagens de PCR. No entanto, os custos dos reagentes e equipamentos para realização desse tipo de análise são relativamente altos em relação aos da PCR tradicional, o que inviabiliza sua aplicação em muitos locais. (KAMAU et al., 2014).

Uma terceira variação, a PCR multiplex, permite que sejam introduzidos diversos conjuntos de iniciadores em uma mesma reação, de forma a amplificar diferentes alvos ao mesmo tempo, por meio de sua dependência do pareamento de bases nitrogenadas. Essa abordagem tem sido utilizada inclusive para detecção de múltiplas infecções (KAMAU et al., 2014).

Schnitzler et al. (1998, 1999) realizaram o primeiro ensaio molecular baseado em PCR com iniciadores específicos e utilização do alvo ITS1 (espaçador interno transcrito 1) que possui variações interespecíficas que permitiram identificar sete espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica de forma específica e com alta sensibilidade. Recentemente, Kawahara et al. (2010) realizaram a mesma abordagem para 6 espécies de *Eimeria* que infectam os bovinos.

Genoma e Escolha do segmento de DNA

O genoma é constituído pelos DNA nuclear e os contidos em organelas como mitocôndrias e cloroplastos (ADAMS e PALMER, 2003). A organização e o tamanho do genoma mitocondrial, por exemplo, variam entre as diferentes linhagens filogenéticas dos eucariotos e apesar do tamanho estar compreendido entre 16.000 pares de base (16 Kb) em humanos a até 500 Kb em algumas espécies de plantas, os genomas mitocondriais, em sua maioria, contêm entre 12 e 20 genes codificadores de proteínas. A maioria destes genes codificam componentes “chaves” da respiração aeróbica e tradução, como as citocromo oxidases e proteínas ribossômicas (ANDERSSON et al., 2003; BULLERWELL; GRAY, 2004). Os genomas eimerianos consistem em um genoma nuclear, composto por 14 cromossomos de 1 a 7 Mb (SHIRLEY, 1994), um genoma mitocondrial de aproximadamente 6200 pb e um genoma apicoplástico circular de aproximadamente 35 kb (SHIRLEY, 1994). Ogedengbe; Barta (2015), descreveram a sequência completa de uma cópia do genoma mitocondrial (mt) de uma *Isospora* sp., causadora de coccidiose sistêmica em canários em cativeiro (*Serinus canaria* Linnaeus). O DNA foi extraído de tecidos infetados com numerosos merozoítos obtidos durante a necropsia diagnóstica (fígado, baço, pulmões e intestino) e, em seguida, amplificado usando PCR de longo alcance com *primers* específicos (COCCI_MT-WG-F e COCCI_ MT-WG-R;

OGEDENGBE et al., 2014) para obter um genoma mt quase completo (6168 pb); A região restante (48 pb) foi amplificada usando um segundo par de *primers* para chegar a um produto de 620 pb com sobreposições consideráveis (387 e 115 pb) com o amplicon primário. O genoma de 6216 pb da *Isospora* sp (GenBank: KP658103) apresentou três genes codificadores de proteínas (COI, COIII e CytB) com 19 fragmentos de LSU e 14 SSU rDNA, mas nenhuma região codificando tRNAs; o genoma partilhou 490% de identidade sequencial com numerosas *Eimeria* spp., que têm genes e ordens de genes idênticos nos seus genomas mt (Ogedengbe et al., 2014).

Os genes ribossômicos nucleares ou genes de rRNA de eucariotos são compostos de repetições arranjadas em repetições seriadas (tandem). Cada uma destas repetições contém as subunidades de rRNA 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores externos transcritos ETS1 e ETS2 e espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2. As subunidades pequenas (SSU ou 18S) e grande (LSU ou 28S) do rRNA têm sido utilizadas para análises filogenéticas de espécies devido ao seu alto grau de conservação em organismos ao longo de toda a escala evolutiva. As regiões espaçadoras, por outro lado, não serem utilizadas funcionalmente, não sofrem grande pressão de seleção e apresentam, portanto, maior grau de divergência. Essas regiões são mais indicadas para estudos de populações, usando-se as variações intraespecíficas como caracteres discriminantes. Outra aplicação dos ITSs é no desenvolvimento de ensaios diagnósticos por PCR. Utilizando-se, por exemplo, iniciadores dirigidos contra as regiões flanqueadoras do ITS1, presentes em regiões altamente conservadas das subunidades SSU (18S) e 5.8S, consegue-se amplificar com sucesso o ITS1 de muitas espécies, e até mesmo de gêneros distintos. Uma vez sequenciados os produtos de amplificação, pode-se desenhar pares de iniciadores específicos para uma ou mais espécies em estudo. Essa abordagem foi utilizada com sucesso para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos em vários organismos, incluindo as sete espécies de *Eimeria* de *Gallus gallus domesticus* (SCHNITZLER et al., 1998; SCHNITZLER et al., 1999).

Genes e regiões gênicas

Para que um gene seja candidato a gene de referência em determinado estudo, deve ser expresso na amostra, não ser coregulado com o gene alvo e apresentar variação de expressão mínima (CHERVONEVA; SCHULZ, 2010). Desta forma, vários genes e fragmentos de genes foram descritos e têm sido alvos da amplificação via PCR com o intuito de diferenciar coccídios, entre eles destacam-se: o gene da cisteína proteinase, além dos genes do RNA ribossomal (rRNA) e mitocondriais que permitem o diagnóstico diferencial (TANAKA, 1997; SOUTO et al., 1999; BARTA, 2001). Os genes do RNA ribossomal se apresentam entre as sequências mais conservadas, encontradas na natureza sendo extensivamente utilizadas para análises filogenéticas e diagnóstico específico. (CUPOLILLO et al., 1995; WALKER et al., 2015; DÁVILA; MOMEN, 2000; ROH, 2023).

Os múltiplos genes para o RNA ribossômico (rRNA) na maioria dos eucariotos estão dispostos em unidades de transcrição que se repetem em conjunto, cada uma contendo um gene para rRNA 18S, 5.8S e 28S (WALKER; PACE, 1977; WELLAUER; DAWID, 1977).

Os genes do rRNA de eucariotos são encontrados como unidades repetitivas sequenciadas (100 a 200 cópias), separadas por espaços não transcritos chamados NTS (*Non Transcribed Spacers*) (GUEVARA et al., 1992). Cada unidade transcrita é composta pelos genes do rRNA 18S, 5,8S e 28S, bem como de várias regiões espaçadoras internas que são transcritas, chamadas ITS (*Internal Transcribed Spacers*), as quais são cercadas por sequências NTS. Pulido et al., (1996) evidenciaram que os NTS são constantemente utilizados nas comparações de espécies fortemente relacionadas.

Genes ribossomais 18 S e 28 S

Existem quatro tipos de rRNAs em organismos eucarióticos, representados por uma cópia no ribossomo. Três desses quatro rRNAs (18S, 5,8S e 28S) são sintetizados por meio de modificações químicas e clivagem de um único grande rRNA precursor. (BRUCE et al., 2017)

18S

O RNA ribossômico 18S é uma parte do RNA ribossômico e do RNA estrutural para o pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos. A subunidade ribossomal 18S é o RNA estrutural para um pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos e dentre as subunidades ribossomais é considerada a mais comum, sendo um dos componentes básicos de todas as células, além de compor uma porção da subunidade menor do ribossomo eucariótico codificado pelo gene 18S rRNA. Apresenta-se muito conservado e, portanto, mais apropriado para resoluções de filogenias de níveis taxonômicos superiores sendo um importante marcador para a PCR de alvo aleatório na triagem da biodiversidade ambiental. Esse gene possui informações que permitem avaliar relações entre organismos com tempos de divergência maiores que 100 milhões de anos. Sendo assim, rápidas radiações adaptativas, que ocorreram a um tempo inferior a 40 milhões de anos, geralmente, estão fora de seus limites de resolução (PHILIPPE et al., 1994).

Essa região é amplamente utilizada na análise molecular para reconstruir a história evolutiva dos organismos, especialmente em vertebrados e coccídios e também em estudos de diversidade biológica sendo provavelmente o gene mais frequentemente sequenciado em eucariotos (BARTA, 2001; VAN DE PEER; DE WACHTER, 1997).

28S

As técnicas moleculares, em que sequências únicas de DNA fornecem níveis extremamente elevados de especificidade para o diagnóstico e identificação das espécies e linhagens dos parasitos, proporcionam alta acurácia na detecção dos oocistos em amostras ambientais e clínicas, para definir a posição taxonômica das várias espécies de parasitos (HIGGINS et al., 2001; THOMPSON e CHALMERS, 2002), são de grande utilidade e possuem ampla aplicação na área da parasitologia, no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, em particular na taxonomia, evolução biológica, genética de populações, epidemiologia e interações com seus hospedeiros (JEX et al., 2008; FAYER et al., 2010), para a identificação e vigilância de agentes infecciosos em tecidos e secreções e na determinação das fontes de infecção, principalmente pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (THOMPSON et al., 1998; MORGAN et al., 2000), sendo utilizadas pela sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez (SINGH, 1997).

ITS

Os ITS são regiões transcritas que apresentam como padrão tamanhos geralmente pequenos, porém não traduzidas dos genes do rRNA, rodeadas por segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR são direcionados e demonstram uma ampla variabilidade. (CUPOLILO et al., 1995; DÁVILA; MOMEN, 2000). Enquanto a sequência do gene do rRNA apresenta variações muito lentamente devido a pressão seletiva, em geral por inserções, deleções ou mutações, as regiões ITS que separam o rRNA 18S do rRNA 5,8S (ITS-1) e o rRNA 5,8S do rRNA 28S (ITS-2) são muito mais variáveis tanto em tamanho como em sequência. A conservação dos genes de rRNA e das sequências ITS parece variar dependendo do organismo (DÁVILA 2002). Diferentemente dos NTS, os ITS são relativamente pequenos (aproximadamente 1kb em *Leishmania sp* e 1.0 a 1.2kb em *Trypanosoma cruzi*) e rodeados por

segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR são direcionados (CUPOLILO et al., 1995; MCLAUGHLIN et al., 1996; FERNANDES et al., 1999; DÁVILA & MOMEN, 2000).

Nem os ITS, nem os NTS são conservados, podendo variar em comprimento e/ou sequência dentro de uma mesma espécie, sendo, portanto, utilizadas como ferramentas moleculares na classificação dos parasitas (PULIDO et al., 1996). Existem também exemplos de conjuntos distintos de genes do rRNA existindo num mesmo organismo (CUPOLILO et al., 1995).

Gene Mitocondrial

COI

O DNA mitocondrial (mtDNA) é pequeno e circular e está presente em grandes quantidades nas células. O genoma mitocondrial é composto por 37 genes que participam do processo de respiração aeróbica, 13 genes codificantes de proteínas, 22 de RNAs transportadores e 2 de RNAs ribossomais (SIMON et al., 1994). Características adicionais como quantitativo elevado de cópias por célula, aparente ausência de íntrons e de recombinação, herança uniparental, genes com taxas evolutivas diferentes e taxas mutacionais, comumente, superiores às de genes nucleares, são responsáveis por tornar os genes mitocondriais marcadores mais comumente utilizados (SATTA et al., 1987; GOTO; KIMURA, 2001; ROKAS et al., 2003).

Os genes de RNAs transportadores (tRNA) apresentam taxas evolutivas menores que os genes codificadores (Simon et al., 1994), enquanto os genes ribossomais (rRNA) apresentam grande variação evolutiva ao longo da molécula e ocorrência de *indels*, variações de comprimento geradas pela inserção ou perda total ou parcial de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA (BUCKLIN et al., 2011) que podem interferir nas análises.

Entre os genes codificantes o COI se apresenta mais conservado em relação as taxas evolutivas a nível de aminoácidos (SIMON et al., 1994), possuindo também um sinal filogenético considerável sobre uma grande variação de níveis taxonômicos (BUCKLIN et al., 2011).

Alguns grupos de espécies apresentam baixa taxa de evolução no gene COI, muitas vezes com valores de divergência genética tão baixos que impedem sua discriminação (STOECKLE et al., 2005; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009) e se sabe que a taxa de evolução do gene COI varia entre grupos e até mesmo entre espécies (WARD et al., 2009).

Para Ogedengbe et al., (2011); Kvicerová; Hypsa (2013) e Genovez-Oliveira (2022), o uso do gene 18S para diferenciação de espécies e detecção de eventos evolutivos recentes, avaliando a diversidade de espécies dentro de Eimeriidae, tem se mostrado inadequado, enquanto o gene COI tem sido considerado o mais adequado nesse sentido.

Existem grupos de espécies que evoluíram recentemente e que, embora possam possuir taxas de evolução para o gene COI semelhantes às encontradas para as espécies com boa resolução em sua separação, não podem ser prontamente identificadas pela metodologia do DNA barcode, por não terem tido tempo suficiente para acumular o número de mutações no gene COI necessário para se proceder a identificação (FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009).

Para a resolução de ambos esses casos (baixa taxa de evolução do gene COI e radiação recente) é sugerido o uso de regiões do DNA que evoluem mais rapidamente e/ou o uso combinado de genes que apresentam boa resolução para a identificação desses táxons (KRESS; ERICKSON, 2007; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008, WARD et al., 2009).

Existem sequências COI insuficientes de espécies de *Isospora* de aves publicadas em

bancos de dados de sequências genéticas para determinar diferenças genéticas inter e intraespecíficas em *Isospora* spp. (BERTO et al., 2023).

O gene da subunidade I (COI) da citocromo c oxidase mitocondrial demonstrou ser um marcador confiável para avaliar a diversidade de espécies dentro de Eimeriidae (KUBISK et al., 2022).

Kubisk et al. (2022) propuseram uma taxonomia integradora, uma vez que o delineamento não seja claro para o gene COI, complementando com análises genéticas, morfológicas, biológicas e ultraestruturais combinadas para identificar as espécies de *Isospora*, por exemplo.

DNA *Barcoding*

Hebert et al. (2003) por meio da utilização de um fragmento da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) de aproximadamente 650 pb, propuseram um padrão para diferenciar a grande maioria, das espécies animais, devido à diversos estudos já realizados com o mesmo segmento, pelos conjuntos robustos de *primers* universais para esta região para a maioria dos filos animais, pelo fato desse gene apresentar um aparente melhor sinal filogenético, possuir uma alta taxa de mutação e por demonstrar maior eficácia na atribuição de indivíduos à categorias taxonômicas elevadas (filos, ordens) por meio da análise das substituições de aminoácidos o qual denominaram *DNA Barcoding*, em analogia ao sistema de identificação de produtos por códigos de barras.

A utilização de DNA barcoding (código-de-barras de DNA) como método para a identificação de organismos completou duas décadas de utilização em 2023, e a implementação e o desenvolvimento das técnicas de DNA barcoding têm mobilizado alguns grupos internacionais de cooperação, principalmente o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) e o *International Barcode of Life* (iBOL), que procuram estimular a pesquisa científica nesta área. Essa abordagem vem se tornando cada vez mais popular (KRESS; ERICKSON, 2007).

Essa metodologia é extremamente útil para avaliar o contexto taxonômico baseado em caracteres morfológicos onde os resultados fornecidos por estudos de DNA barcoding podem contribuir na formulação (e reformulação) de hipóteses filogenéticas, de sistemas de classificação e também de limites taxonômicos (SEBERG et al., 2003; STACE, 2005). Segundo Li et al. (2011) os benefícios do uso de DNA barcoding vão além de sua mera utilização para a resolução de problemas de identificação de espécies no contexto taxonômico. Essa técnica se aplica a qualquer situação que se beneficie de um processo rápido e eficiente de identificação de espécies, incluindo a avaliação da biodiversidade (PARMENTIER et al., 2013).

Análises de sequência de DNA: Sequenciamento genético

O sequenciamento genético objetiva a determinação da ordem exata dos nucleotídeos de um determinado segmento de DNA, sendo utilizado principalmente no diagnóstico de espécies infecciosas (SMITH; NICHOLS, 2010). As amostras, já submetidas a PCR, deverão sofrer purificação antes de iniciar as etapas de sequenciamento, pois com a remoção dos dNTPs e iniciadores que restaram das reações anteriores ocorre a diminuição da interferência nas reações seguintes (SAMBROOK et al., 2001). As amostras serão submetidas novamente a uma PCR (Nested-PCR), com formulação específica, sendo que os iniciadores são utilizados em reações independentes para que as duas sequências obtidas possam ser posteriormente alinhadas, pois são complementares, otimizando dessa forma a acurácia do resultado final (SAMBROOK et al., 2001). A sequência obtida será submetida ao GenBank (*Genetic Sequence Data Bank*) pelo BLAST e a identificação da espécie em questão é realizada em segundos (ALTSCHUL et al., 1997).

Análise filogenética

A análise filogenética estima a relação entre os genes ou fragmentos de genes inferindo sua história comum, se caracterizando como uma ferramenta essencial em um número crescente de áreas de pesquisa, para a análise exploratória de sequências de DNA e proteínas, sendo capazes de mostrar o caminho evolutivo e epidemiológico de agentes etiológicos de doenças e/ou o caminho evolutivo de seus hospedeiros. (CALDART et al., 2016).

Uma árvore filogenética, representa as relações ancestral-descendente entre organismos ou sequências genéticas e deve ser considerada como uma hipótese de um relacionamento evolutivo entre um grupo de organismos. No caso da filogenia molecular, as sequências de nucleotídeos ou proteínas estão nas pontas (*tips*) das árvores, enquanto os ramos (*branch*) conectam as sequências aos seus ancestrais. (HOLDER M.& LEWIS, 2003).

Para Oliveira, (2011) um dos grandes desafios na análise filogenética é a obtenção de resultados acurados e dentre os fatores mais importantes para uma reconstrução filogenética acurada estão o número de genes amostrados, a amostragem de taxa, e o método de reconstrução utilizado.

Os métodos filogenéticos bayesianos revolucionaram a forma de análise dados de sequências genômica. Como exemplo podemos citar a análise filogeográfica da disseminação de vírus em humanos, inferência de história filogeográfica e migração entre espécies, análise de taxas de diversificação de espécies, estimativa de tempo de divergência e inferência de relações filogenéticas entre espécies ou populações. A popularidade dos métodos bayesianos se popularizou por razão do desenvolvimento de poderosos modelos de análise de dados e pela disponibilidade de programas de computador de fácil utilização para a aplicação dos modelos. (WILFERT, 2016).

A filogenia molecular dos coccídios tem sido objeto de diversos estudos (CAVALIER-SMITH, 1983, 1993; TENTER et al., 2002).

Identificação molecular de coccídios na atualidade

Isoospora butcheriae descrita por Yang et al. (2018) e caracterizada molecularmente no RNA ribossômico 18S, 28S e no gene mitocondrial do citocromo oxidase (COI). No *locus* 18S, com base na sequência de 1210 pb, exibiu 99,9; 99,8; 99,7 e 99,5% de similaridade com *Isoospora* sp. MAH-2013a (KF648870) de *Lamprolornis superbus* no Canadá, *Isoospora* sp. MS-2003 (AY33157) de *Plocepasser mahali* na América, *Isoospora* sp. Tóquio (AB75786) do Japão. Em uma análise adicional de um subgrupo de sequências 18S de 300 pb de comprimento, incluindo *I. anthochaerae* e os outros três *Isoospora* de aves da Austrália Ocidental, revelou que *I. butcheriae* apresentou 98,3% de similaridade tanto com *Isoospora* sp. MAH-2013a (KF648870) e *I. MS-2003* (AY33171). No *locus* 28S, apresentou 97,3% de similaridade com *Isoospora* sp. MS-2003 de *Melospiza crissalis*. No *locus* COI, exibiu 99,8% de similaridade com *I. neochmiae*.

Isoospora sepetibensis foi o primeiro parasita coccidiano de um Traupídeo do Novo Mundo a ter sua sequência *cox1* de 215 pb de comprimento depositada no banco de dados do GenBank. (GENOVEZ-OLIVEIRA et al., 2019).

Eimeria columbinae foi identificada molecularmente por Ortúzar-Ferreira, et al. (2020), através do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e pelo gene 18S pequena subunidade ribossomal RNA (18S) do hospedeiro *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809), na região do Médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Sendo a única espécie dentro da ordem Columbiformes com sequência de COI depositada no GenBank, teve sua

análise filogenética baseada no gene COI, ficando próxima a um clado com similaridade de 98,5% com um *Isospora* sp. recuperado *Plectrophenax nivalis* (Linnaeus, 1758) na República Tcheca (TREFANCOVÁ et al. 2019). Outras *Isospora* spp. de aves do Velho Mundo, mas também do Novo Mundo, como *Isospora sporophilae* de *Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869) no Brasil (RODRIGUES et al. 2018), se apresentaram em cladogramas vizinhos. A similaridade em comparação com *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016) foi de 95%.

Na análise filogenética baseada no 18S, *E. columbinae* apresentou-se em um clado composto por todos os coccídios de Columbiformes depositados no GenBank, com similaridade de 100% com *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016). Cladogramas vizinhos foram compostos por *Eimeria* spp. de aves não columbiformes, como papagaios, perus e galinhas, com similaridade de aproximadamente 99,5%; e por *Cyclospora* spp. e *Eimeria* spp. de mamíferos, como primatas, morcegos, roedores e ruminantes, com uma similaridade de aproximadamente 99,3%.

Esta similaridade de 100% entre *E. columbinae* e *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016), de hospedeiros relativamente distantes, deixou evidente que o gene 18S é excessivamente conservado, pelo menos na parte amplificada, sendo potencialmente adequado para estudos filogenéticos de táxons superiores, mas inadequado para diferenciação e identificação em nível de espécie. Foi observada também a diferença de apenas duas substituições de nucleotídeos *E. columbinae* e *Eimeria* spp. de perus e papagaios, que são espécies filogeneticamente muito distantes.

Ortúzar-Ferreira, et al. (2020), descreveram e identificaram molecularmente *Isospora oliveirai*, através da amplificação do DNA do oocisto que mostrou uma banda clara de c.250 pb. A análise filogenética incluiu 23 sequências para *Isospora* spp. *Isospora oliveirai* apresentou-se separadamente no cladograma e teve a maior similaridade de 97% com *Isospora serinuse* dos canários das ilhas canárias (Linnaeus, 1758) e *Isospora* spp. de *Parus major* e *Erithacus rubecula*.

A análise filogenética não colocou *I. oliveirai* em nenhum monofiletismo; pelo contrário, foi separado de um grande clado contendo vários *Isospora* spp. de Passeriformes. Esse resultado pode ser explicado pelas grandes semelhanças entre esses *Isospora* spp. neste grande clado, que variam entre 98 e 100%, enquanto *I. oliveirai* diferiu destes *Isospora* spp. em mais de 3%. De qualquer forma, a principal inconsistência na filogenia estava na comparação com *I. lopesi*, que é a única a ser classificada na mesma parvordem (Tyrannida) que *I. oliveirai* entre as espécies de coccídeos que possuem sequências de COI depositadas no Genbank; no entanto, teve uma baixa similaridade com *I. oliveirai* de apenas 95% e situa-se em um clado distante com outras espécies de coccídeos relatadas na Subordem Tyranni (suboscines). Assim, estes resultados não são conclusivos para estabelecer a filogenia de *I. oliveirai* e outros *Isospora* spp. de Passeriformes; no entanto, estes devem ser mais elucidativos, pois mais *Isospora* spp. são sequenciados para o gene COI e depositados no Genbank. Ortúzar-Ferreira, et al. (2020).

Isospora phylidonyrisae descrita por (YANG et al., 2021), através da caracterização molecular realizada no RNA ribossômico 18S e 28S e nos loci mitocondriais (mt) citocromo oxidase (COI). A sequência do rRNA 28S foi a mais semelhante a *Isospora anthochaerae* (KF766053) e *Isospora manorinae* (KT224381), ambas com 98,2% de similaridade genética. A análise filogenética das sequências genômicas 18S e mt COI indicou que *Isospora phylidonyrisae* foi geneticamente similar a *Isospora coronoidae*, isolada de *Corvus coronoides* na Austrália Ocidental, com 99,3% e 98,4% de homologia, respectivamente.

Isospora lugensae, descrita por (Yang et al., 2021), através da análise do genoma mitocondrial completo (mtDNA), revelou 3 genes codificadores de proteínas (CytB, COI e COIII), 18 LSU e 14 fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU), sem genes de RNA de transferência, com um comprimento total de 6257 pb. A análise filogenética das sequências ribossômicas genômicas de SSU indicou que *Isospora lugensae* foi geneticamente semelhante a *Eimeria reichenowi*, isolada de *Grus japonensis* do Japão, com 96,6% de homologia. A

sequência do mtDNA é mais semelhante à *Isospora serinuse* com uma similaridade genética de 95,8%.

Isospora feroxis redescrita molecularmente por (ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2021), forneceu uma caracterização genotípica preliminar por meio do sequenciamento do citocromo c mitocondrial gene da subunidade 1 da oxidase (COI). A amplificação do DNA do oocisto de *I. feroxis* mostrou uma banda clara de c. 250 pb. A análise filogenética incluiu 20 sequências de *Isospora* spp. *Isospora feroxis* teve as maiores semelhanças de 97% com *Isospora massardi* de *Turdus flavipes* (Vieillot) e *Isospora manorinae* de *Manorina flavigula* (Gould).

Isospora leptopogoni descrita por MELO et al. (2022), através da identificação molecular por meio do sequenciamento do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial. A análise filogenética colocou *I. leptopogoni* próximo a outras *Isosporas* spp. registradas de hospedeiros filogeneticamente relacionados e da mesma região biogeográfica.

Isospora basileuterusi descrita por MELLO et al. (2022), após análise molecular do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (cox 1), revelou uma similaridade de 99,5% com *Isospora serinuse* de canários insulares *Serinus canaria*, da Austrália Ocidental.

OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo maior identificar geneticamente coccídios parasitas de algumas aves silvestres capturadas em regiões de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. Os objetivos específicos são:

- (1) Isolar oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres, os quais tenham sido previamente identificados morfológicamente;
- (2) Extrair o DNA e amplificar e sequenciar diferentes regiões gênicas de genes mitocondriais;
- (3) Avaliar a aplicabilidade destas novas sequências na diferenciação de espécies e estudos filogenéticos.

No cumprimento destes objetivos, esta tese apresentou uma revisão da literatura científica no tema de identificação molecular de coccídios de aves silvestres, e nos capítulos I, II, III e IV os resultados de identificação molecular, incluindo novas regiões gênicas, de quatro espécies coccidianas, os quais correspondem a quatro artigos publicados em periódicos científicos internacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, K. L.; PALMER, J. D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29: 380-395. 2003.
- ALANAZI, A. D.; ALYOUSIF, M. S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in Riyadh Province, Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 943- 945, 2011.
- ALBERTS, B.; JHONSON A.; JULIAN L.; MORGAN D., RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P.; WILSON J.; HUNT T.; BREDA A. E.; CRISTIANO A.; BIZARRO V.; RENARD G. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: **Artmed**, 2010, 1396 p.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389- 3402, 1997.
- ANDERSSON, S.G.E., KARLBERG, O., CANBÄCK, B.; KURLAND, C.G. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 358: 165-179. 2003.
- ANDRADE, L.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.; MELLO E. R.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA A. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P. Observations on an *Eimeria* sp. (Apicomplexa) from the green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) in Southeastern Brazil: an example of how the ecological aspects of the host can be essential for the identification of its coccidians. **Parasitology Research** 121, 1059–1063, 2022.
- ARISUE N, HASHIMOTO T. Phylogeny e evolução de apicoplasts e parasitas apicomplexan. **Parasitology International**. 2015; 64:254–9.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. *vb*: Chapman; Hall, 1994.
- AXIMOFF, I.; RODRIGUES, R. C. Histórico dos incêndios florestais no Parque Nacional do Itatiaia. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 83-92, 2011.
- BARTA J.R Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites *Vet. Parasitol.*, 101 (2001), pp. 175-186
- BARTA J.R., SCHRENZEL MD, RIDEOUT BA (2005) The Genus *Atoxoplasma* as a Junior Objective Synonym of the Genus *Isospora* Species Infecting Birds and Resurrection of *Cystoisospora* as the Correct Genus for *Isospora* Species Infecting Mammals. **Journal Parasitology** 91:726–727. <https://doi.org/10.1645/GE-3341.1>
- BARTA J.R., OGEDENGBE J.D., MARTIN D.S., SMITH T.G. Phylogenetic position of the adeleoriniocidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal Eukaryot Microbiologic** 2012; 59(2): 171-180. PMID:22313415. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x)
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene**, Huntington, v. 93, n. 2, p. 317–23, 1984.
- BELLI S. I., SMITH N. C.; FERGUSON D.J.P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! **Trends Parasitol.** 22:416-423. 2006.

- BENELLI, G., CASELLI, A., DI GIUSEPPE, G., CANALE, A. Control of biting lice, Mallophaga - a review. **Acta tropica**, v. 177, p. 211-219, 2017.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Three New Coccidian Parasites of Brazilian Tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) from South America. **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 77-81, 2008a.
- BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Two New Coccidian Parasites of Green-Winged Saltator (*Saltator similis*) from South America. **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 263-267, 2008b.
- BERTO B. P.; LUZ H. B.; FLAUSINO W.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, v. 74, p. 75-80, 2009a.
- BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. *Isoospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 301-304, 2009b.
- BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Three new species of *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buffyfronted seedeater *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Passeriformes: Emberizidae) from South America. **Systematic Parasitology**, v. 73, p. 65-69, 2009c.
- BERTO B. P.; FLAUSINO W.; LUZ H. B.; FERREIRA I.; LOPES C. W. G. Two new *Isoospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. **Parasitology Research**, v. 105, p. 635-639, 2009d.
- BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L.M.C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. New isosporoid coccidian parasites of sayaca tanager, *Thraupis sayaca*, from South America. **Acta Parasitologica**, v. 54 (n. 2): 90-94, 2009e.
- BERTO, B. P. Morfologia e sistemática de coccídios (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de aves Passeriformes da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. 2010. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, 2010.
- BERTO B. P, FLAUSINO W, MCINTOSH D, TEIXEIRA- FILHO W. L, LOPES C. W. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic parasitology**, 80, 159-204, 2010.
- BERTO B. P., FLAUSINO W., MCINTOSH D., TEIXEIRA-FILHO W. L.; LOPES C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology** 80:159-204, 2011.
- BERTO B. P.; MCINTOSH D.; LOPES C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** v. 23, p. 1-15, 2014.
- BERTO. B. P.; LUZ.H.R.; Parasitas de Aves Silvestres do Parque Nacional do Itatiaia. Ministério do Meio Ambiente **ICMBio**, PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA BOLETIM, Nº 25, 2016.
- BERTO, B. P., MACHADO, E. L., HOSSOTANI, C. M.. Taxonomia integrativa para os

coccídeos tradicionais (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de canários insulares (Aves: Passeriformes: Fringillidae): Distribuição mundial, caracterização morfológica e molecular, reavaliações e estabelecimento de sinônimos juniores. **Syst Parasitology**. 2023.

BOWMAN D. D.G. Parasitologia Veterinária. **Elsevier**. Rio de Janeiro, cap. 3, p. 95- 96, 2010.

BRAGA E. F.; BRAGA E.; BRAGA, K. L. M.; BRAGA, A.I.S. Diagnóstico sorológico de toxoplasma gondii através do teste da hemaglutinação indireta em ovinos criados em dois municípios do nordeste paraense. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 1- 19, 2011.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA Barcoding of Marine Metazoa. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, p. 471-508, 2011.

BULLERWELL, C.E.; GRAY, M.W. Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Current Opinion in Microbiology* 7: 528- 534. 2004.

CALDART E. T., MATA H., CANAL C. W.; RAVAZZOLO A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1392. 2016.

CASAS, M.C.; DUSZYNSKI, D.W.; ZALLES, L.M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 247-251, 1995.

CANNING E. U.; ANWAR M. Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites. **Journal Protozoology** 15, 290-8, 1968.

CHERVONEVA, I.; LI, Y.; SCHULZ, S. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 253, s/N, 2010.

CAI X.; FULLER A. L.; MCDUGALD L. R.; ZHU G. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. **Gene**. Dec 4; 321:39-46, 2003.

CALDART E. T.; MATA, H. C. W.; RAVAZZOLO A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1392, 2016.

CARRENO R. A.; BARTA J. R. An Eimeriid Origin of Isosporoid Coccidia with Stieda Bodies as Shown by Phylogenetic Analysis of Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences. **Journal Parasitology**. 85 :77–83, 1999.

CASLEY, D. Primer on molecular biology. Technical report, U. S. Department of Energy, **Office of Health and Environmental Research**. 1992.

COELHO C. D, BERTO B. P.; NEVES D. M.; OLIVEIRA V. M.; FLAUSINO W.; LOPES C. W. G. Two new Isospora species from the saffron finch, *Sicalis flaveola* in Brazil. **Acta Parasitol** 2011b; 56 (3): 239-244.

COELHO C. D.; BERTO B. P.; NEVES D.M.; OLIVEIRA V. M. D.; FLAUSINO W.; LOPES C. W. G. Oocyst shedding by green-winged-saltator (*Saltator similis*) in 12 Studies on oocysts the diagnostic of coccidiosis and *Isospora similisi* (Apicomplexa: Eimeriidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 2013; 22(1): 64-70.

CORY S.; ADAMS J.M. A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes, **Cell**, 11, 795—805, 1977.

- CBRO. Lista das aves do Brasil. Rio de Janeiro: **Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos**, 123 pp. 2021.
- CHAPMAN H. D. e SHIRLEY M. W. The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. **Avian Pathology** 32, 115-27, 2003.
- CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research: A review. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p.501-511, 26 fev. 2014.
- CONDE M. M. S.; LIMA H. R. P.; PEIXOTO A. L. Aspectos florísticos e vegetais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: MENEZES, L. F. T., PEIXOTO, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. (Eds.). História Natural da Marambaia. Rio de Janeiro: **EDUR**, p. 133-168, 2005.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr. G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. - Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 73: 145 – 155, 1995.
- CURRENT W. L.; UPTON S. J.; LONG P. L. Taxonomy and Life Cycles. In Coccidiosis of Man and Domestic Animals, (ed. P. L. Long), pp. 1-17. Boston: **CRC Press Inc.** 1990.
- CURRENT W. L. Techniques and laboratory maintenance of Cryptosporidium. In: DUBEY J. P.; SPEER C. A.; FAYER R. (Ed.). Cryptosporidiosis of man and animals. **Boca Raton: CRS**, 1990. p. 31-49.
- DAUGSCHIES A, NAJDROWSKI M. Eimeriosis in cattle: current understanding. **Journal Veterinary Medicine B Infect Diseases Vet Public Health**. 2005 Dec;52(10):417-27.
- DÁVILA, A.M.; MOMEN, H. - Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitology.*, 94: 651-654, 2000.
- DE QUEIROZ K. Ernest Mayr and the modern concept of species. **PNAS**, v.102, p.6600-6607, 2005.
- DE QUEIROZ K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879- 886, 2007.
- DOBELL C. The Discovery of the Coccidia. *Parasitology*, 14 (3-3), 342-348. Doi: 10.1017/S0031182000010258, 1922.
- DOGIEL V. A. **General parasitology**. Leningrad, Izdatielstvo Leningradskogo Univiersitieta, 1962.
- DOLNIK O. V.; DOLNIK, V. R.; BAIRLEN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. **Ardea**. v. 98, n. 1, p. 97-103. 2010.
- DORRESTEIN, G. M. Bacterial and parasitic diseases passerines. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 433-451, 2009.
- DUBEY J. P.; MILLER N. L.; FRENKEL J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J Exp Med**. Oct 1;132(4):636-62, 1970.
- DUBEY J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary parasitology**, v. 95, n. 2, p. 89-131, 2001.
- DUBEY J. P.; SCHARES G. Neosporosis in animals the last five years. **Veterinary**

parasitology, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P. HOWE D. K.; FURR M.; SAVILLE W. J.; MARSH A. E.; REED S. M.; GRIGG M. E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, 2015.

DUSZYNSKI D. W.; SPEER C. A.; CHOBOTAR B.; MARCHIONDO A. A.; Finestructure of the oocyst wall and excystation of *Eimeria procyonis* from the American raccoon (*Procyon lotor*). **Zeitschrift fur Parasitenkunde- Parasitology Research** 65:131–136, 1981.

DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.

DUSZYNSKI D. W.; COUCH L.; UPTON S. J.. The coccidia of the world [disponível em <https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/>]. 1999.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 139-142, 1999.

EL-SHERRY S.; OGEDENGBE M. E.; HAFEEZ M. A.; BARTA J. R. Divergent nuclear 18S rDNA paralogs in a turkey coccidium, *Eimeria meleagridis*, complicate molecular systematics and identification. **International Journal Parasitology** 43:679–685, 2013.

EHRET T.; SPORK S.; DIETERICH C. Dual RNA-seq reveals no plastic transcriptional response of the coccidian parasite *Eimeria falciformis* to host immune defenses. **BMC Genomics** 18, 686, 2017.

ENTZEROTH R.; SCHOLTYSECK E.; SEZEN I. Y. Fine structural study of *Eimeria truncata* from the domestic goose (*Anseranserdom.*). **Zeitschriftfur Parasitenkunde**, v. 66, p. 1–7, 1981.

ESCOBAR GRIMALDI, M. J.; LÓPEZ RIVAS, A. J.; RAMÍREZ LÓPEZ, P. E. (2010) Determinación de fuentes de transmisión de coccidiosis (*Eimeria* spp) en aves de la línea hy line brown desarrolladas en jaula en dos granjas de El Paisnal, Departamento de San Salvador, El Salvador. Bachelor thesis, **Universidad de El Salvador**.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J.; WALKER, J. H.. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 3–4, p. 187–192, 2010.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; JANSEN, A.M.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B.; COURA, JR. - Populational heterogeneity of brazilian *Trypanosoma cruzi* Isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94: 195 – 197, 1999.

FERNANDEZ S.; PAGOTTO A. H.; FURTADO M. M.; KATSUYAMA A. M.; MADEIRA A. M.; GRUBER A. A. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. **Parasitology** 127(Pt 4):317–325. 2003.

FERREIRA, F. S.; BRITO S. V.; RIBEIRO S. C.; SALES D. L.; ALMEIDA W. O. A zoologia

e a botânica do ensino médio sob uma perspectiva evolutiva: uma alternativa de ensino para o estudo da biodiversidade. **Cadernos de cultura e ciência**, v. 2, n. 1, p. 60-66, 2009.

FRÉZAL, L. E.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C.; Intestinal coccidiosis in: FRIEND. M.; FRANSON, J. C. Field manual of wildlife diseases: general field and procedures and diseases of birds. Washington, **Biological Resources Division**. v. 26, p. 207-213, 1999.

GARCIA, F. G. Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e receptores Toll envolvidos na resposta imunológica in vitro à *Cystoisospora belli*. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

GARCIA L. S.; SHIMIZU R. Y. Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**. Jun;35(6):1526-9, 1997.

GENOVEZ-OLIVEIRA, J.; CARDOZO, S.; OLIVEIRA, Á.; LIMA, V.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. Morphological and Molecular Identification of *Isoospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a New Host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoninae) in South America. **Acta Protozoologica**. 58. 2019.

Genovez-Oliveira J. L.; Oliveira M. S.; Thode-Filho S.; Cardozo S. V.; Oliveira Á. A.; Lima V. M.; Ferreira I.; Berto B. P. Identificação morfológica e molecular de *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, *Ferreira*; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de tordos *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) na América do Sul. **Parasitology Internacional** 75:102040. 2020.

GOTO, S. G.; KIMURA, M. T. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 18, n. 3, p. 404-422, 2001.

GUEVARA, P.; ALONSO, G.; DA SILVEIRA, J.F.; DE MELLO, M.; SCORZA, J.V.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J.L. - Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. **Molecular Biochemical Parasitology**, 56(1):15-26, 1992.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Mar. Biology**., v.137, p.435-446, 2000.

GRECA, M. P. S. Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos de Curitiba em região metropolitana. Dissertação (Mestrado- Microbiologia, Parasitologia e Patologia). **Universidade Federal do Paraná**, 2010.

GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau domestique; multiplicité des especes. **Annales de Parasitologie humaine et Comparée**, v. 57, p. 209 - 233, 1982.

HAFEEZ MA, StÁsiak I, Delnatte P, El-Sherry S, Smith DA, Barta JR. Description of two new *Isoospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Parasitology Resources**. 2014 Sep;113(9):3287-97. doi: 10.1007/s00436-014-3992-8. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24948107.

HAFEEZ M. A.; BARTA J. R.; The complete mitochondrial genome sequences of two *Isoospora* species (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing coccidiosis in superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Mitochondrial DNA B. Resources** . Nov 27;2(2):895-896, 2017.

- HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related Genera. London: **University Park Press**, 482 p, pp 151–154, 1973.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 270, p. S596-S599, 2003.
- HAJIBABAEI M.; SINGER G. A. C.; CLARE E. L.; HEBERT P. D. N.; Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biology**. 5:24, p.1-15, 2007.
- HAUG A.; THEBO P.; MATTSSON J. G.; A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. **Veterinary Parasitology** 146(1–2):35–45, 2007.
- HAWKINS, B. A.; FIELD R.; CORNELL H. V.; CURRIE D. J.; GUÉGAN J.; KAUFMAN, D. M.; KERR, J. T.; MITTELBACH G. G.; OBERDORFF T., O'BRIEN E.M.; PORTER, E. E.; TURNER, J. R. G. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. **Ecology**, 84: 3105-3117, 2003.
- HIKOSAKA K.; WATANABE Y.; TSUJI N.; KITA K.; KISHINE H.; ARISUE N.; PALACPAC N. M.; KAWAZU S.; SAWAI H.; HORII T.; IGARASHI I.; TANABE K.. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Molecular Biology and Evolution** May; 27(5):1107-16, 2010a.
- HIKOSAKA K, NAKAI Y, WATANABE YI, TACHIBANA SI, ARISUE N, PALACPAC NM, TOYAMA T, HONMA H, HORII T, KITA K, TANABE K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Mitochondrion**, 2010b.
- JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 4, p. 304-317, 2008.
- JINNEMAN K. C.; WETHERINGTON J. H.; HILL W. E.; ADAMS A. M.; JOHNSON J. M.; TENGE B. J.; DANG N. L.; MANGER R. L.; WEKELL M. M. Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. oocysts directly from raspberries. **Journal of Food Protection** 61(11):1497–1503, 1998.
- JIRKU, M.; MODRY D.; SLAPETA, J.R.; KOUDELA B.; LUKES, J. The Phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the Evolution of Excystation Structures in Coccidia. **Protisty**, v. 153, p. 379-390, 2002.
- KALANON M, MCFADDEN GI. Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. **Biochemical Society Transactions**. 2010 Jun;38(3):775-82.
- KAMAU, E. et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.
- KARAMANOU M.; POULAKOU-REBELAKOU E.; TZETIS M.; ANDROUTSOS G. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. **Rev. Argent. Microbiology**. Oct-Dec;42(4):311-4, 2010.
- KAWAHARA F, ZHANG G, MINGALA CN, TAMURA Y, KOIWA M, ONUMA M, NUNOYA T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. **Vet. Parasitol.** Nov 24;174(1-2):49- 57, 2010.

- KAYA G.; DALE C.; MAUDLIN I.; MORGAN K. A novel procedure for total nucleic acid extraction from small numbers of *Eimeria* species oocysts. **Turkiye Parazitoloji Dergisi** 31(3):180–183, 2007.
- KNIGHT, A.; EWEN J. G; BREKKE P.; SANTURE A. W. The evolutionary biology, ecology and epidemiology of coccidia of passerine birds. **Advances in Parasitology**, v. 99 p. 35-60, 2018.
- KRESS, W.J.; ERICKSON, D.L. A two-locus globalDNAbarcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnHpsbA* spacer region. **Plos One**, v. 2, n, 6, p. e508, 2007.
- KUBISKI S. V., WITTE C., BURCHELL J. A., CONRADSON D., ZMUDA A., BARBON A. R., VILCHES-MOURE J. G., FELT S. A., RIDEOUT B.A. Mitochondrial Gene Diversity and Host Specificity of *Isospora* in Passerine Birds. **Frontiers in Veterinary Science**. 2022
- KVIČEROVÁ J, HYPŠA V. A. Incongruências hospedeiro-parasita no roedor, *Eimeria* sugerem um papel significativo da adaptação em vez da cofilogenia na manutenção da especificidade do hospedeiro. **Plos One**. 2013.
- LASERNA-MENDIETA E. J.; SALVADOR-MARTÍN S.; ARIAS A.; LÓPEZ-CAUCE B.; MARÍN-JIMÉNEZ I.; MENCHÉN L. A.; MARÍN-RUBIO L.; ONTAÑÓN Rodríguez J.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ L. A.; LUCENDO A. J.; Single nucleotide polymorphisms in ADAM17, IL23R and SLCO1C1 genes protect against infliximab failure in adults with Crohn's disease. **Biomedicine; Pharmacother**. 2023
- LEVINE, N. D. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 719 e 723, 1982.
- LEVINE N.D. **Veterinary protozoology**. Ames, Iowa State University Press. 414p, 1985.
- LI D. Z., GAO L. M., LI H. T., WANG H., GE X. J., LIU J.Q., CHEN Z.D., ZHOU S.L., CHEN S. L., YANG J. B., FU C. X., ZENG C. X., YAN H. F., ZHU Y. J., SUN Y. S., CHEN S.Y., ZHAO L., WANG K., YANG T., DUAN G. W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 108, 19641–19646. 2011.
- LINNAEUS C. **Systema naturae**. Holmiae (Laurentii Salvii): Stockholm, 1758.
- LINDSAY D. S.; DUBEY J. P.; BLAGBURN B. L.; Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. **Clinical Microbiology Rev**. 1997 Jan;10(1):19-34. 1997.
- LING K. H.; RAJANDREAM, M. A.; RIVAILLER, P.; IVENS, A.; YAP, S. J.; MADEIRA, A. M.; MUNGALL, K.; BILLINGTON, K.; YEE, W. Y.; BANKIER, A. T. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. **Genome Research** 17, 311-9. 2007.
- LIPSCOMB D.; PLATNICK N.; WHEELER Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends Ecology. Evol.**, v. 18, p. 65–66, 2003.
- LOYFER N.; MAGENHEIM J.; PERETZ A.; CANN G.; BREDNO J.; KLOCHENDLER A.; FOX-FISHER I.; SHABI-PORAT S.; HECHT M.; PELET T.; et al. A DNA methylation atlas of normal human cell types. **Nature**. 613:355–364. 2023.

- LONG P. I. The biology of the coccidia. **Edward Arnold Publishers**, London, 1982.
- LONG P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the Identification of Species of Eimeria. **The Journal of Protozoology**, 31 (4), 535–541. 1984.
- LOURENÇO, E. C.; COSTA, L. M.; SILVA, R. M.; ESBÉRARD, C. E. L. Bat diversity of Ilha da Marambaia, Southern Rio de Janeiro State, Brazil (Chiroptera, Mammalia). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 511-519, 2010.
- LOPES, B. B. Coccídios como biomarcadores de impacto ambiental em Passeriformes na Ilha da Marambaia e no Parque Nacional do Itatiaia, RJ. 2018. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2018.
- MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 147, n. 5, p. 824–828, 1983.
- MANWELL, C.; BAKER, C.M.A. A sibling species of seacucumber discovered by starch-gel electrophoresis. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 10, p. 39-53, 1963.
- MARQUARDT W. C. Host and site specificity in the Coccidia: A perspective. **The Journal of Protozoology** , 28 (2), 243–244. 1981.
- MARQUES, T.; OLIVEIRA, E. F.; MORAIS, A. C. S.; CARVALHO, L. E. F. Avaliação do grau de assimetria em três espécies de aves da família Columbidae na ESEC-SERIDÓ, Nordeste do Brasil. Curso de Campo Ecologia da Caatinga, **PPG Ecologia**, UFRN, p. 67-71, 2011.
- MARONEZI, C.; OLIVEIRA M.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; MELLO E. R.; CEPEDA P. B.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; BERTO P. B. *Isoospora spp.* (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny ; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. **Systematic Parasitology**. 99, 285–297, 2022.
- MARTÍNEZ C. M. A.; SÁENZ G. I. S.; BERTO B. P., ÁVILA, Z. D. E.; RAMÍREZ A. R.; CISNEROS, V. K. W.; RAMOS, Z. J. J. Identificación de especies de Eimeria presents en caprinos (*Capra aegagrus hircus*) en Nuevo León, México. **Revista MVZ Córdoba**, 27(s), e2560-e2560, 2022.
- MATIOLI S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Matioli, S.R.; Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 181–190. 2012.
- MACPHERSON J. M.; GAJADHAR A. A. Differentiation of seven Eimeria species by random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Parasitology** 45(3– 4):257–266. 1993.
- MASSEY, J. G. Diseases and medical management of wild Passeriformes. Seminars in Avian and Exotic. **Pet Medicine**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2003.
- MCDUGALD L. R.; REID, W. M. Cocciosis. In **Diseases of Poultry**, (ed. B. W. Calnek), pp. 929. Ames: Iowa State University Press. 1995.
- MCLAUGHLIN, G.L.; SSENKONGA, S.S.; NANTEZA, E.; RUBAIRE-AKIKI, WAFULA, O.; HANSEN, R.D.; VODKIN, M.H.; NOVAK, R.J.; GORDON, V.R.; MONTENEGROJAMES, S.; JAMES, M.; AVILES, H.; ARMIJOS, R.; SANTRICH, C.; WEIGLE, K.; SARAVIA, N.; WOZNIAK, E.; GAYE, O.; MDACHI, R.; SHAPIRO, S.Z.;

CHANG, K.P.; KAKOMA, I. PCR-based detection and typing of parasites. In: AZCEL, M.A.; ALKAN, M.Z. Parasitology for the 21st Century. Chapter 25. **CAB International**. Wallingford Oxon; 1996.

MEIRA, J. A.; CORRÊA M.O. A. Isosporose humana. Considerações sobre 28 casos. **Revista Internacional Adolfo Lutz** (São Paulo), 10 (número único): 117-139, 1950.

MEYER de SCHAUENSEE, R. A guide to the birds of South America. Philadelphia: **Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 1982. Reimpressão de 1970.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.

MELO, J. O.; ANDRADE, L. A. S.; MARONEZI, C.; MELLO E. R.; OLIVEIRA M. S.; CARDOZO S. V.; FRANCO H. A.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; BERTO B. P. *Isospora leptopogoni* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sepia-capped flycatcher *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 (Passeriformes: Rhynchocyclidae) in South America. **Systematic Parasitology** 99, 525–534, 2022.

MELLO ER, OLIVEIRA MS, ANDRADE LAS, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, BERTO BP. *Isospora basileuterusi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America. **Curr Research in Parasitology & Vector-borne Diseases**. 2022 Jan 31;2:100079. doi: 10.1016/j.crvbd.2022.100079. PMID: 36589869; PMCID: PMC9795353.

MENEZES, L. F. T.; ARAUJO, D. S. D. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da restinga de Marambaia, RJ. **Acta Botanica Brasilica**, 13(Acta Bot. Bras., 13(2)), 223–235, 1999.

MIGUEL-OTEO M.; JIRAM A. I.; TA-TANG TH.; LANZA M.; HISAM S.; RUBIO J. M.; Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. Mar;10(3):299-304. Mar 7. PMID: 28442114. 2017.

MORGAN, U.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R.C.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virusinfected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1180–1183, 2000.

MORRISON, David A., et al. "The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa)." **International Journal for Parasitology** 34.4 (2004): 501-514.

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.402-407, 2002.

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p. 995–998, 1998.

MORGAN J.A.T.; Morris G.M.; Wlodek B.M.; Byrnes R.; Jenner M.; Constantinoiu C.C.; ANDERSON G.R.; LEW-TABOR A. E.; MOLLOY J. B., GASSER R. B.; JORGENSEN W. K.; Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens, **Molecular and Cellular Probes**, Volume 23, Issue 2, 2009.

MORGAN J. A. T.; GODWIN R. M.; Mitochondrial genomes of Australian chicken *Eimeria* support the presence of ten species with low genetic diversity among strains. **Veterinary Parasitology.**; 243 :58–66. 2017.

MOTRIUK-SMITH D, Seville RS, Quealy L, Oliver CE. Comparison of the ITS1 and ITS2 rDNA in *Eimeria callospermophili* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Sciurid Rodents. **Journal Parasitology** 2011; 97(2): 305-310. PMID:21506777 PMCID:PMC3157313. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2535.1>

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.402-407, 2002.

NAMDAR A. Pegah et al. Multiplex Snapshot minisequencing for detection of common PAH gene mutations in Iranian patients with Phenylketonuria. **Iranian Biomedical Journal**, v. 27, n. 1, p. 5-5, 2023.

NOVAES, J.; MANHA A.; STELMASTCHUK L.; MADEIRA A.. Aspectos gerais da biologia do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. de galinha doméstica. **Revista da Biologia**. 6b. 2011.

OGEDENGBE JD, Hunter DB, Barta JR. Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. **Veterinary Parasitology** 2011a; 178(3-4): 350-354. PMID:21295915. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.009> » <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.009>

OGEDENGBE JD, Hanner RH, Barta JR. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **International Journal Parasitology** 2011b; 41(8): 843-850. PMID:21515277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>

OGEDENGBE, M. E., BRASH, M., & BARTA, J. R. The complete mitochondrial genome sequence of *Isospora* sp. (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing systemic coccidiosis in domestic Canaries (*Serinus canaria* Linn.), **Parasites & Vectors**, 2015.

OGEDENGBE M. E.; EL-SHERRY S.; WHALE J.; BARTA JR.. Complete mitochondrial genome sequences from five *Eimeria* species (Apicomplexa; Coccidia; Eimeriidae) infecting domestic turkeys. **Parasites & Vectors**, 7 :335, 2014.

OLIVEIRA, U. C. *Eimeria* spp. de coelho e galinha domésticos: desenvolvimento de ensaios moleculares e caracterização filogenética. 2011. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - **Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, M. S.; MELLO E. R.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P.. Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America. **Parasitologic Research** 120, 2585–2593, 2021.

OLIVEIRA F. C. R.; GALLOA S. S. M.; ELIZEUA T. K. S.; EDERLI N. B. *Isospora bertoi* n. sp. of the saffron finch, *Sicalis flaveola* (Aves: Passeriformes) from Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 83, 2023.

Ortúzar-Ferreira, CN, Oliveira, MS, Genovez-Oliveira, JL *et al.* Coccídios de Columbiformes: uma revisão taxonômica de suas espécies de Eimeriidae e *Eimeria columbinae* de *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) do Brasil. **Parasitology Research**, 267–281 (2020)

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., MELLO E. R.; MELO J.O.; OLIVERA M. S.; THODE-FILHO S.; CARDOZO S. V.; OLIVEIRA Á. A.; LIMA V. M.; FERREIRA I.; BERTO B. P. Redescription and molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. **Systematic Parasitology** 98, 333–341, 2021.

PACHECO, F. T. F.. Avaliação de métodos de diagnóstico laboratorial de coccídeos intestinais oportunistas e caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* isoladas em amostras fecais. 2013. 105 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal da Bahia**, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2013.

PAGE C. D.; HADDAD K. Coccidial infections in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.4, n. 3, p. 138-144, 1995.

PAPAVERO N. Essays on the History of Neotropical Dipterology: with special reference to collectors: 1750-1905: Vol. I. 1971.

PARMENTIER I., DUMINIL J., KUZMINA M., PHILIPPE M., THOMAS D. W., KENFACK D., CHUYONG G. B., CRUAUD C, HARDY O. J. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? **Plos One**, 8, e54921. 2013.

PELLEGRINI M.; MANNING J.; DAVIDSON N.. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*, **Cell**, 10 (1977) 213-224.

PELLÉRDY L. P. Coccidia and coccidiosis. 2^a ed. Berlim: **Verlag Paul Parey e Akademiai Kiady**. 1974. Acessado em <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19752285198>.

PEREIRA, L. H. G. et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River basin, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 21(S2), p. 1-9, 2010.

PERIZ J.; GILL A. C.; HUNT L.; BROWN P.; TOMLEY F. M.. The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of *Eimeria tenella* form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells. **The Journal of Biological Chemistry** 282 (23): 16891-16898. 2007.

PHILIPPE, H.; CHENUIL, A.; ADOUTTE, A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? **Development**, p. 15–25, 1994.

PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica** 62: 163-170, 1996.

REGITANO, L. C. A. Introdução à Análise de Marcadores Moleculares. In: Regitano, L.C. de A.; Coutinho, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, p. 26-39, 2001.

REGINATO, CAROLINE Z. et al. Métodos de extração de DNA para detecção molecular de *Eimeria spp.* em bovinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online]. v. 40, n. 7, pp.

514-518, 2020.

ROBERTS L. S.; JANOVY J. J. Foundations of parasitology. 8th ed. **The McGrawHill Companies**, Inc. New York, NY: McGraw-Hill. 720 p. 2009.

RODRIGUES MB, DA SILVA LM, LOPES BDO B, BERTO BP, LUZ HR, FERREIRA I, LOPES CW. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeiriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia island, Brazil. **Zootaxa**. 2015 Oct 28;4034(1):193-6. doi: 10.11646/zootaxa.4034.1.10. PMID: 26624438.

RODRIGUES, M. B.; OLIVEIRA, J. L. G.; SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G. N.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) (Passeriformes: Thraupidae: Sporophilinae) and *Haplospiza unicolor* Cabanis, 1851 (Passeriformes: Thraupidae: Diglossinae) as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro, Lopes, 2005 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 96, p. 423-431, 2018.

ROH S. G., KIM J., KU B. K., LEE K. Case study: Pathological and phylogenetic analysis of coccidiosis in two goats with heavy infection of unrecorded *Eimeria* sp. **Parasitology International**. 2023.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Ecology and Evolution**, v.18, n. 8, p. 411-417, 2003

ROSALES, M.J.; MASCARO, C. First report of *Cyclospora talpae* (Pellerdy et Tanyi, 1968) (Apicomplexa) in *Talpa occidentalis* (Insectivora) in the Iberian Peninsula. **Parasitology Research**, v. 59, p. 135-136, 1999.

RUGGIERO M. A.; GORDON D. P.; ORRELL T. M.; BAILLY N.; BOURGOIN T.; BRUSCA R. C.; CAVALIER-SMITH T.; GUIRY M. D.; KIRK P. M. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLoS One**, v. 10 (6):1–54., e0130114, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^a ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Nova York, Vol. 1 e 2, 2001.

SATTA, Y.; ISHIWA, H.; CHIGUSA, S. I. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 638-650, 1987.

SAVAGE, J. M.. Systematics and the biodiversity crisis. **BioScience**, v. 45, p. 673-679, 1995.

SCHARES G.; PANTCHEV N.; BARUTZKID.; HEYDORN A. O.; BAUER C.; CONRATHS F. J.. *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in feces collected from dogs in Germany. **International Journal Parasitology** 35: 1525-1537. 2005.

SCHNITZLER B. E.; THEBO P. L.; MATTSSON J. G.; TOMLEY F. M.; SHIRLEY M. W.; Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. **Avian Pathology**; 27(5):490-7, 1998.

SCHNITZLER B. E.; THEBO P. L.; TOMLEY F. M.; UGGLA A.; SHIRLEY M. W.; PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. **Avian Pathology**. Feb; 28(1):89-93, 1999.

- SCHRENZEL M. D.; MAALOUF G. A.; GAFFNEY P. M.; TOKARZ D.; KEENER L. L.; MCCLURE D.; GRIFFEY S.; MCALOOSE D.; RICKOUT B. A.; Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. **Journal Parasitology** 91:635–647, 2005.
- SEBERG O., PETERSEN G. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? **Plos One**, 4, e4598. 2009.
- SEMADS. Atlas das Unidades de Conservação da natureza do Estado do Rio de Janeiro. Secretaria estadual de meio ambiente e desenvolvimento sustentável do Rio de Janeiro. **São Paulo: Metavideo SP Produção e Comunicação Ltda.**, 48 p, 2001.
- SHIRLEY, M. W. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. **Parasitology Research** 80, 366-73, 1994.
- SHIRLEY M. W. Eimeria species and chicken lineages. In J Eckert, Braun R, SHIRLEY M. W, Coudert P, Biotechnology - Guidelines on research techniques in coccidiosis , **European Commission**, Luxembourg, p. 1-51, 1995.
- SHIRLEY, M. W. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella* - a coccidium from the chicken. **International Journal Parasitology** 30, 485-93, 2000.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1135- 1145, Oct. 1997.
- SMITH J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal Food Protist**. May;56(5):451-461. 1993.
- SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 133- 142, 2005.
- SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, cap. 6, p. 173-208, 2007. SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium: Detection in water and food*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.
- SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. (2012) Polimorfismos de isozimas. In: Matioli, S.R.; Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 165– 170.
- SOULSBY, E. J. L. Parasitología y enfermedades parasitarias. 7ª ed. México: **Interamericana**, 823 p, 1987.
- SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGELES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83: 141 – 152, 1996.
- SOUZA, P. X. Nova abordagem laboratorial na investigação das enteroparasitoses em humanos. 80 f. Dissertação (mestrado), Niterói, **Universidade Federal Fluminense**, 2005.
- SOUZA-DANTAS L. M.; BASTOS O. P. M.; BRENER B.; SALOMÃO M.; GUERRERO J.; LABARTHE N. V. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de

- helminthos gastrintestinais de gatos domésticos. **Ciência Rural**, 37(Cienc. Rural, 2007 37(3)), 904–906, 2007.
- SOUZA-DANTAS, L. M. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintos gastrintestinais de gatos domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 904-906, 2007.
- STACE C. A. Plant taxonomy and biosystematics - does DNA provide all the answers? **Taxon**, 54, 999-1007. 2005.
- SICK, H. (1997) Ornitologia Brasileira. **Nova Fronteira**, Rio de Janeiro.
- STOECKLE, M.; WAGGONER, P.E.; AUSUBEL, J.H. Barcoding life, illustrated. Goals, rationale, disponível em (www.barcoding.si.edu). 2005.
- STUCKI U.; BRAUN R.; RODITI I. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. **Experimental Parasitology**, 76(1):68–75, 1993.
- TANAKA, T. Differential diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infection by PCR of cysteine proteinase genes. **J. Japan Ass Infect. Dis.**, 71: 903-909, 1997.
- TANG X.; HUANG G.; LIU X.; EL-ASHRAM S.; TAO G.; LU C.; SUO X. An optimized DNA extraction method for molecular identification of coccidian species. **Parasitology Research**, 117(3), 655–664, 2018.
- TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS R. H.; VOGLER A. P. DNA points the way ahead in taxonomy. **Nature** 418, 479, 2002.
- TEDLA M. A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review, **Parasite Epidemiology and Control**, Volume 6. 2019.
- TEIXEIRA, M. Anátomo-clínica e Biologia em frangos de corte experimentalmente infectados com *Eimeria acervulina* e suplementados com betaína. 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2007.
- TEDLA, M. A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 6, 2019.
- TENTER, A.; BARTA, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D.W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D.A.; THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 505– 616, 2002.
- THOMPSON R. C. A. et al. Basic biology of *Cryptosporidium*. **Parasitology Laboratory Lawrence Journal**, access: set (2022): <https://www.k-state.edu/parasitology/basicbio>, 2022.
- TREFANCOVÁ A, MÁCOVÁ A, KVIČEROVÁ J. Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? **Protist** 170:104–120. 2019.
- TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using twostep Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n.5, p. 966-970, 1997.
- VAN DE PEER, Y. & DE WACHTER, R. 1997. Evolucionary relationships among the

- eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. **Journal of Molecular Evolution**, 45: 619-630.
- WAGGONER B. **History of Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)**, 1973.
- WALKER, T.A. and PACE, N.R., Transcriptional organization of the 5.8S ribosomal RNA cistron in *Xenopus laevis* ribosomal DNA, *Nuci. Acid Resourch.*, 4 - 695--601. 1977.
- WALKER R. A., SHARMAN P. A., MILLER C. M., LIPPUNER C., OKONIEWSKI M., EICHENBERGER R. M., RAMAKRISHNAN C., BROSSIER F., DEPLAZES P., HEHL A. B., SMITH N. C. RNA Seq analysis of the *Eimeria tenella* gametocyte transcriptome reveals clues about the molecular basis for sexual reproduction and oocyst biogenesis. **BMC Genomics**. Feb 18;16(1):94. 2015.
- WARD, R. D.; HOLMES, B. H.; YEARSLEY, G. K. DNA barcoding reveals a likely second species of Asin sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 458-463, 2008.
- WELLAUER, P. K.; DAWID, I. B. The structural organization of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*, **Cell**, 10 (1977) 193—212, 1977.
- WENYON, C. M. **Protozoology**. Vol. 2. NewYork: William, Wood and Company, 1.396p, 1926.
- WILFERT, L. The deformed wing virus is a recent global epidemic in bees caused by Varroa mites. **Science** 351, 594–597. 2016.
- WILSON RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. **Microbiol Mol Biol Rev**. Mar;61(1):1-16, 1997.
- WOODMANSEE, D. B. Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. **Journal of Protozoology**, v. 34, n. 4, p. 398-402, 1987.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 8392-8396, 1977.
- XIAO L, FAYER R, RYAN U, UPTON SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin Microbiol Rev**. 2004 Jan;17(1):72-97, 2004.
- YABSLEY, M. J. *Eimeria*. In. ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, 64 D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley-Blackwell. **ACADEMIA**. Cap.8, p. 162-180. 2008.
- YANG R, BRICE B, ELLOIT A, LEE E, RYAN U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria paludosa* coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) in a dusky moorhen (*Gallinula tenebrosa*, Gould, 1846) in Australia. **Experimental Parasitology**. 2014 Dec;147:16-22..
- YANG, R.; BRICE, B.; RYAN, U. *Isospora anthochaerae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a red wattlebird (*Anthochaera carunculata*) (Passeriformes: Meliphagidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology** v. 140, p. 1–7, 2014
- YANG, R.; BRICE, B.; ELLIOT, A.; RYAN, U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa: Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. **Experimental Parasitology**, v.166, p.124-130, 2016.
- YANG, RONGCHANG & BRICE, BELINDA & JIAN, FUCHUN & RYAN, UNA. (2018).

Morphological and molecular characterisation of *Isospora butcheriae* n. sp. in a silvereye (*Zosterops lateralis*) (Latham, 1801). **Parasitology Research**. 117. 10.1007/s00436-018-5808-8.

YANG, R.; BRICE, B.; LIU, Q.; BERTO, B. P.; AUSTEN, J.; RYAN, U. (2021). Morphological and genetic characterization of the first *Isospora* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). **Parasitology Research**, 120, 1037–1047.

ZHAO X. M.; DUSZYNSKI D. W.; LOKER ES. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. **Journal Microbiology Methods** 44(2):131–137, 2001.

CAPÍTULO I

**REDESCRIBÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Isospora ferox* BERTO,
LUZ, FLAUSINO, FERREIRA; LOPES, 2009 (Eimeriidae) DE PAPA-MOSCAS
Myiarchus ferox (Gmelin) (Tyrannoidea) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO

No presente estudo, *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira ; Lopes, 2009 é redescrita a partir de fotomicrografias e de novas amostras de um papa-moscas *Myiarchus ferox* (Gmelin), que é o hospedeiro-tipo na Ilha da Marambaia no Sudeste do Brasil. Além disso, o bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurescens* Spix é registrado como novo hospedeiro para esta espécie, em uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, no interior do Sudeste do Brasil, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar, via sequenciamento do gene mitocondrial, citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI). A micrópila e a parede rugosa do oocisto são acrescentadas à descrição de *I. ferox*, além de outros detalhes. Esta é a sexta espécie identificada de aves Suboscine (Tyranni) a ter uma sequência gênica COI depositada no GenBank e, embora ainda não seja possível tirar conclusões sobre a filogenia de *Isospora* spp. de Passeriformes pelo gene COI, a análise molecular confirmou as diferenças entre as espécies de coccídios de tiranídeos.

Palavras-chave: *Isospora*, sequenciamento, citocromo *c* oxidase.

ABSTRACT

In the present study *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 is redescribed from the photosyntypes and from new samples from a short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin), which is the type-host in the type locality, the Marambaia Island in Southeastern Brazil. In addition, the yellow-olive flycatcher *Tolmomyias sulphurescens* Spix is recorded as a new host for this species, in a new locality, the Itatiaia National Park, in the interior of Southeastern Brazil, providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene. Micropyle and rough oöcyst wall are added to the description of *I. ferox*, in addition to other details. This is the sixth species identified from suboscine birds (Tyranni) to have a COI gene sequence deposited in GenBank and, although it is not yet possible to make conclusions on the phylogeny of *Isospora* spp. From Passeriformes by the COI gene, the molecular analysis confirmed the differences between coccidian species from tyrant-flycatchers.

Keywords: *Isospora*, sequencing, cytochrome *c* oxidase.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade na Região Neotropical é muito relevante para pesquisadores de todo o mundo, entre vários aspectos, devido ao seu potencial e recorrentes novas descobertas (Tundisi; Matsumura-Tundisi, 2008). Nesse contexto, a classe Aves se destaca por sua grande diversidade e exuberância, atraindo não só cientistas, mas também ecoturistas, especialmente observadores de aves (Stotz et al., 1996).

O Brasil é o segundo país da região neotropical com maior número de espécies de aves; onde, atualmente, existem 1.919 espécies listadas pelo Comitê de Registros Ornitológicos do Brasil (Piacentini et al., 2015). No contexto de pesquisas sobre aves neotropicais, há o estudo de seus parasitas, que tem sido cada vez mais relacionado à ecologia, fisiologia e conservação de espécies silvestres. Entre os parasitas das aves, os protozoários coccídios destacam-se como a causa da morbidade e mortalidade em condições desfavoráveis entre hospedeiro e ambiente, para um tipo de comensalismo em populações de aves em ambientes conservados e equilibrados (Berto; Lopes, 2020).

Os Tiranídeos representam a superfamília, Tyrannoidea (Piacentini et al., 2015), ou simplesmente a família Tyrannidae, de acordo com a BirdLife International (Del Hoyo; Collar, 2016), em que a distribuição se estende pela América do Norte, Central e do Sul, estando mais concentrada na Região Neotropical. Atualmente é a maior superfamília/família da classe Aves em todo o mundo, com 450 espécies registradas.

No Brasil, 218 espécies estão listadas (Piacentini et al., 2015; Del Hoyo; Collar, 2016). Mesmo com essa grande diversidade, há poucos relatos de espécies coccidianas de papa-moscas, quando comparados com outras famílias de aves. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo redescrever *Isoospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 a partir dos Fotomicrografias e a partir de amostras de um papa-moscas *Myiarchus ferox* (Gmelin), que é o hospedeiro-tipo na localidade do tipo, a Ilha de Marambaia, no Sudeste do Brasil.

Além disso, o bico-chato-de-orelha-preta, *Tolmomyias sulphurescens* Spix é registrado como um novo hospedeiro para esta espécie, em uma nova localidade, o Parque Nacional de Itatiaia, no interior do Sudeste do Brasil, proporcionando uma caracterização genotipada preliminar através do sequenciamento do gene citocromomo mitocondrial C oxidase subunidade 1 (COI).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Entre agosto de 2014 e agosto de 2018, foram realizadas 19 expedições em diferentes locais do Parque Nacional de Itatiaia (22° 27'S, 44° 36' O), área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2016), para capturar aves silvestres com redes de neblina e coletar amostras fecais.

Um total de sete bico-chato-de-orelha-preta, *T. sulphurescens* foram capturados. Além do Parque Nacional de Itatiaia, uma expedição em setembro de 2014 foi realizada na Ilha da Marambaia (23°3' 38,86'S, 43°58' 47,56"O), no litoral do estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, onde foi capturado um papa-moscas, *M. ferox*. As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação da espécie, a ave foi fotografada e liberada e amostras fecais foram colocadas em tubos para centrífuga contendo uma solução de dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) em 1:6 (v/v).

2.2 Análise morfológica

As amostras foram levadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 10 dias, ou até que aproximadamente 70% dos oocistos estivessem esporulados, os oocistos isolados por flutuação, na solução saturada de açúcar de *Sheather's* (gravidade específica: 1.20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014). As observações morfológicas, desenhos de linhas, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eurekam 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), os desenhos foram editados usando Corel DRAW®, e Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Versão 11.0, Corel Corporation, Canadá) e todas as medições foram realizadas em micrômetros.

2.3 Análise molecular

Um oocisto individual de uma amostra fecal de *T. sulphurescens* foi isolado a partir de diluições seriadas dos oocistos, em gotas, em uma lâmina de microscópio usando uma micropipeta estéril. Este oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até a clarificação do sobrenadante (Dolnik et al., 2009).

O DNA foi extraído dos oocistos e purificados utilizando o *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, São Paulo, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. Para o rompimento completo do oocisto, quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA.

A amplificação via PCR, para o gene COI, foi realizada utilizando-se um nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015) e os *primers* externos utilizados COIbF1 (5' - GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A - 3') e COIbR1 (5' - CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA - 3') produziram um fragmento do tamanho de 302 bp, os *primers* internos COIbF2 (5' - GGG CAC ATC ATA TGA TGA C - 3') e COIbR2 (5' - ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA - 3') produziram uma amplificação de 257 bp.

A reação do PCR continha: 10 µl 5x Green GoTaq® *Flexi Buffer*, 3 µl de 25 mM MgCl₂, 1 µl de 10 mM dNTPs, 0.4 IM de cada *primer*, 1.25 units of GoTaq® DNA *polymerase*, 3 µl de DNA (para reação primária) e 3µl de produto de PCR primário (para a reação secundária). Tanto a PCR primária, quanto a secundária foram realizadas utilizando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5', seguido por 35 ciclos de 94°C por 30'', 47°C por 45'', e 72°C por 1' e uma extensão à 72°C por 5'.

Os amplicons da segunda rodada de PCR foram purificados utilizando-se a Purificação *Qiagen MinElute PCR* (Qiagen, São Paulo, Brasil). Todos os produtos de PCR foram sequenciados usando os *primers* de PCR frente e reversa pela *Ludwig Biotechnology*, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados utilizando o programa Chromas 2.6 (*Technelysium Pty Ltd*, Queensland Austrália).

2.4 Análises da sequência de DNA

A sequência recém gerada, foi comparada com as de *Isospora* spp. e outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank, utilizando-se da *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As árvores filogenéticas foram construídas para *Isospora* spp. nas sequências de COI alinhadas com outras espécies depositadas no GenBank.

As análises de alinhamento e parcimônia foram realizadas utilizando a versão 7 do MEGA, utilizando *ClustalW* como algoritmo de alinhamento (Tamura et al., 2007), a história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias foram calculadas usando o método “Tamura-Nei”, baseado na seleção de modelos usando *ModelTest* no MEGA 7.

As análises de *bootstrap* foram realizadas utilizando-se 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvores inferidas.

As fotomicrografias de *I. ferox* de *M. ferox* identificados em Berto et al. (2009a), que foram depositados na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na UFRRJ sob o número do repositório P-30/2009.

3. RESULTADOS

Foram examinados sete *T. sulfurescens* capturados no Parque Nacional de Itatiaia, no local conhecido como “Trilha das Borboletas” ou “Trilha Borboleta” (22°26'57.00"S, 44°36'25.00"O), e cinco deles, (71%), testaram positivo para a coccídios.

O papa-moscas *Myiarchus ferox* capturada na Ilha de Marambaia, também testou positivo para coccídios.

Todos os oocistos observados foram morfológicamente identificados como *I. ferox*. Eimeriidae Minchin, 1903 *Isospora* Schneider, 1881 *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009

Hospedeiro: *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Tyrannidae) papa-moscas.

Outro hospedeiro: *Tolmomyias sulphurescens* Spix (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Rhynchocyclidae) bico-chato-de-orelha-preta (presente estudo).

Localidade: Ilha da Marambaia (23°3' 38,86'S, 43°58' 47,56"O), sudeste do Brasil

Outra localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O), sudeste do Brasil.

Espécimes representativas: As fotomicrografias e desenhos de linha estão depositados e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>), na coleção de parasitológica do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P-30/2009.

Outros espécimes (presente estudo): As fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução K₂Cr₂O₇ de 2,5% (Williams et al., 2010) de *T. sulfurescens* estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número MZURPTZ202025. As fotomicrografias estão depositadas e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>), na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, nos termos dos números do repositório 108/2020 (*T. sulphurescens*) e 109/2020 (*M. ferox*). As fotos de comprovação, dos espécimes hospedeiros, estão depositadas na mesma coleção.

Local de infecção do hospedeiro: Desconhecido; oocistos recuperados de fezes.

Prevalência: 75% (6/8) geral; 71% (5/7) para *T. sulphurescens*; e 100% (1/1) para *M. ferox*.

Sequência de DNA representativa: Sequências de COI representativas dos oocistos de *T. sulfurescens* foram depositadas no banco de dados do GenBank, sob o número MT563402.

3.1 Oocisto esporulado

Oocistos (n = 81) subesferoidais/subesféricos, 18-23 x 18-23 (20.7 x 20.0); índice

morfométrico: 1,0-1,1 (1,04). Parede bicamada, apresentando espessura, 1.3-2.0 (1.7), camada externa com rugosidade mínima a moderada, c.2/3 de espessura total. Micrópila presente, 4.4-9.2 (7.4) de largura. Resíduo do oocisto ausente, mas, 1-3 (geralmente 2 ligados), grânulos polares presentes.

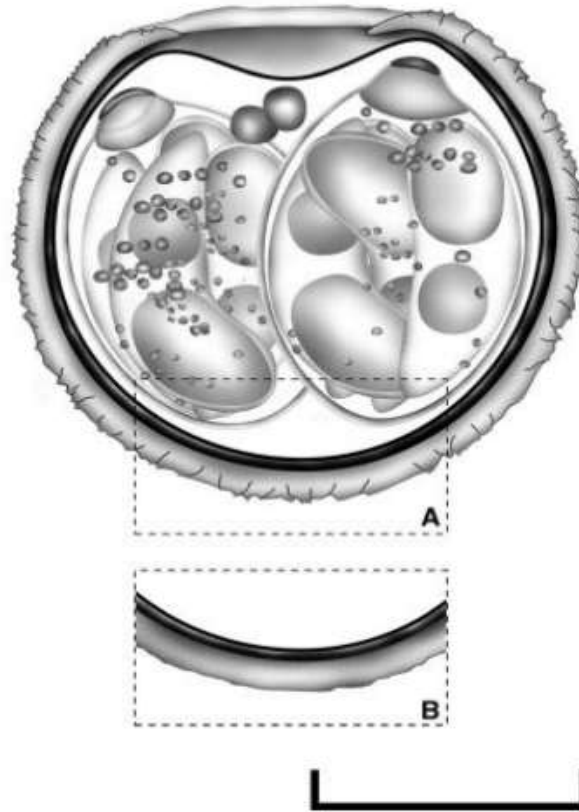


Figura 1. Composição do desenho do oocisto esporulado para redescrição de *Isospora ferox* de papa-moscas, destacando a camada externa da parede oocisto com rugosidade moderada (A) ou mínima (B). Barra de escala: 10 μ l.

3.2 Esporocisto e Esporozoítos

Esporocistos (n = 70) 2, ovoidal a elipsoidal, 11-15 x 8-10 (13.4 x 9.2); índice morfométrico de 1,3-1,6 (1,45). Corpo de Stieda presente, achatado em forma de meia-lua, 0,5-0,7 x 1,3-2.2 (0.6 x 1.7); corpo substieda presente, arredondado a trapezoidal, 1.0- 1.8 9 2.4-3.3 (1.3 9 2.9), com destaque semelhante a um substieda compartimentalizado; corpo do parastieda ausente; resíduo do esporocisto presente, composto de esferículas de diferentes tamanhos. Esporozoítos 4, vermiformes, 10-11 x 3-4 (10.9 x 3.6), corpo refrátil posterior e núcleo localizado centralmente.

3.3 Observações

Quatro *Isospora* spp. são registrados de Tiranídeos do Novo Mundo (**Tabela 1**). Até hoje, *I. ferox* tinha os menores oocistos registrados entre estes *Isospora* spp.; no entanto, no presente estudo, a ampla adição de medições de oocisto de dois hospedeiros aumentou a gama de medidas de oocistos, tornando-as compatíveis com *Isospora atilae* Rodrigues, Silva, Lopes,

Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015 e *Isospora lopesi* Silva Carvalho; Berto, 2018. No entanto, os oocistos de *I. ferox* são diferenciados desses *Isospora* spp. pela forma menos alongada dos seus esporocistos, corpo de substieda menor e mais delicado e, principalmente, pela presença da micrópila e da parede de oocisto áspero que foram adicionados na redescritção atual.

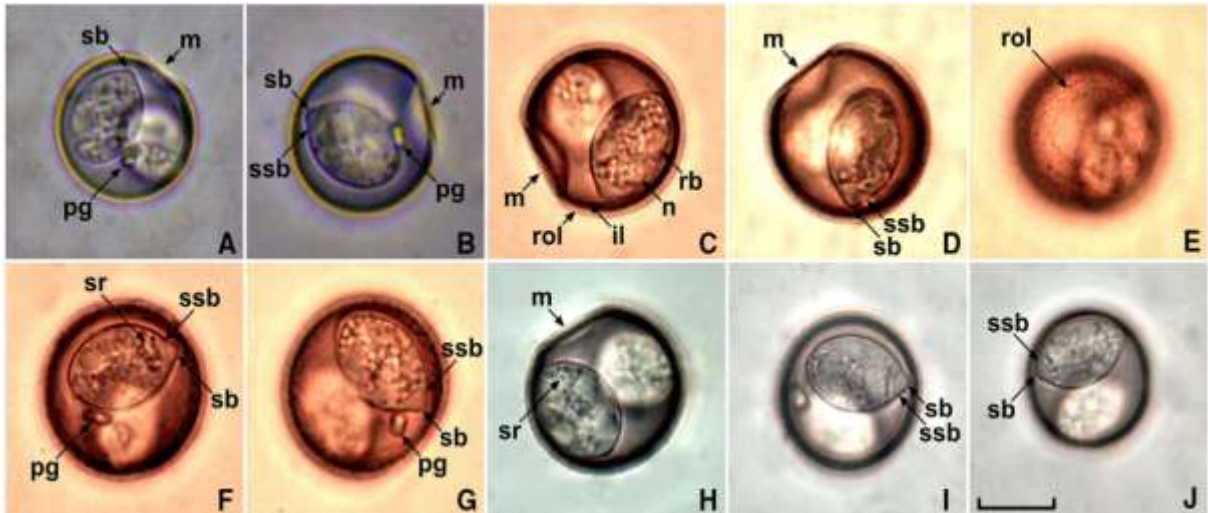


Figura 2. Oocistos esporulados de *Isospora ferox* de fotomicrografias (A, B) e de novas amostras de um papa-moscas, *Myiarchus ferox* (C-G) e de bico-chato-de-orelha-preta *Tolmomyias sulphurescens* (H-J). Para observação: camadas internas (il) e ásperas (rol) da parede oocisto; micrópila (m); núcleo (n); granulo polar (pg); corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo de esporocisto (sr); corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 μ l.

3.4 Análise filogenética

A amplificação de DNA do oocisto de *I. ferox* mostrou uma faixa clara de c.250 bp. A análise filogenética incluiu 20 sequências para *Isospora* aviária disponíveis no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi utilizado como grupo externo. *Isospora ferox* apresentou-se em um grande clado contendo *Isospora* spp. de turdídeos e traupídeos, mas também contendo *Isospora* spp. de hospedeiros suboscines (Tyranni), que é a subordem de *T. sulfurescens* e *M. ferox*. *Isospora ferox* teve as maiores semelhanças de 97% com *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galva, Ferreira; Lopes, 2014 do sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot) e *Isospora manorinae* Yang, Brice, Jian; Ryan, 2016 de *Manorina flaviula* (Gould).

Tabela 1 - Morfologia comparativa de *Isozona* spp. registrada no Novo Mundo tiranídeos (Tyrannoidea).

Espécies	Hospedeiro	Referência	Forma do oocisto	Size (µm)	Forma index	Grânulo Polar	Parede	Micrópila	Forma Esporocisto	Tamanho (µm)	Forma index	Corpo Stieda	Corpo SubStieda	Resíduo Do esporocisto
<i>Isozona ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae)	Berto et al. (2009a)	subspheroidal	18–20 × 17–20 (18.7 × 18.0)	1.0–1.1 (1.1)	usually 2	low roughness	presente	ovoidal	11–13 × 8–10 (11.7 × 8.5)	1.0–1.5 (1.4)	flattened, (0.3 × 1.2)	prominent, (1.2 × 2.5)	difuso
	<i>M. ferox</i>	presente study	subspheroidal	21–23 × 20–23 (21.9 × 21.4)	1.0–1.1 (1.03)	1–3 (usually 2 bonded)	low to moderate roughness	presente	ovoidal to elipsoidal	14–15 × 9–10 (14.8 × 10.1)	1.4–1.6 (1.47)	flattened to half-moon-Formad, 0.5–0.7 × 1.3–2.2 (0.6 × 1.7)	rounded to trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9)	difuso
	<i>Tolmomyias sulphureus</i> Spix (Rhynchocyclidae)			18–23 × 18–22 (20.5 × 19.8)	1.0–1.1 (1.04)					11–15 × 8–10 (13.1 × 9.1)	1.3–1.6 (1.45)			
<i>Isozona mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae)	Berto et al. (2009b)	elipsoidal	23–31 × 19–23 (28.3 × 21.2)	1.2–1.4 (1.3)	1–2	suave	ausente	elongate-elipsoidal	17–22 × 10–13 (19.7 × 11.7)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 × 1.1)	prominent, (1.4 × 2.1)	compact, subspherical
<i>Isozona atillae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae)	Rodrigues et al. (2015)	subspheroidal to elipsoidal	18–22 × 18–21 (20.3 × 19.0)	1.0–1.2 (1.07)	1–2	suave	ausente	elipsoidal	12–15 × 7–9 (13.5 × 7.9)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 × 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 × 4.0)	difuso
<i>Isozona lopesi</i> Silva-Carvalho ; Berto, 2018	<i>Platyrrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	subspheroidal to ovoidal	18–24 × 18–22 (20.6 × 19.7)	1.0–1.2 (1.05)	1	suave	ausente	elipsoidal	12–16 × 8–11 (14.4 × 8.6)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-Formad, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	difuso

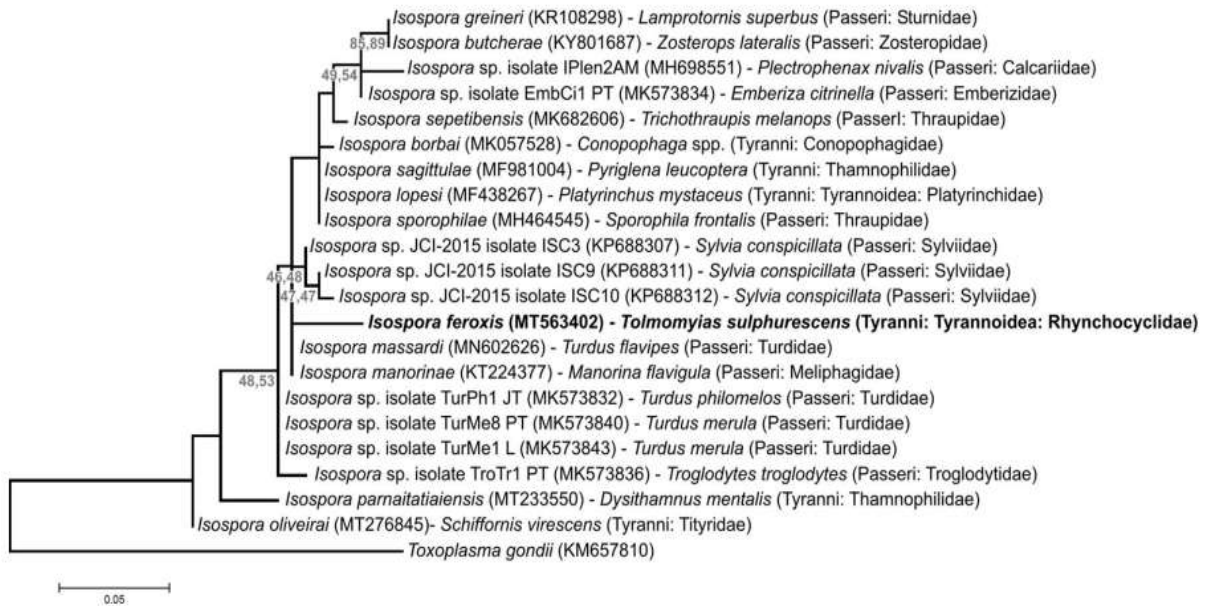


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números dos nós representam o suporte ao *bootstrap* (1.000 replicações; apenas valores > 40% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

4 DISCUSSÃO

A descrição das espécies coccidianas se fundamenta na morfologia dos oocistos embora complementações ecológicas, biogeográficas, patológicas e moleculares sejam importantes para a caracterização de uma espécie (Duszynski; Wilber, 1997; Tenter et al., 2002; Berto et al., 2014).

Nesse contexto, Duszynski; Wilber (1997) estabeleceram que as identificações devem ser baseadas na morfologia comparativa entre as espécies coccidianas registradas na mesma família do hospedeiro. Desde então, os estudos mais completos e confiáveis sobre taxonomia coccidiana de aves silvestres demonstraram especificidade no nível familiar do hospedeiro (Berto et al., 2013). No entanto, às vezes, o número de espécies coccidianas registradas em uma família hospedeira é muito baixo ou inexistente (como por exemplo: Cardinalidae), tornando necessário comparar com espécies coccidianas descritas a partir de níveis taxonômicos mais elevados do hospedeiro, como Superfamília, Parvordem ou Infraordem.

Além disso, as divergências nos sistemas de classificação de Aves dificultam a identificação de coccídios com base na especificidade da família hospedeira. As classificações de Del Hoyo; Collar (2016) e Piacentini et al. (2015) que subsidiaram o presente estudo, classificam os tiranídeos como uma Família e Superfamília, respectivamente; portanto, apesar dessa divergência de nível e classificações em diferentes famílias por Piacentini et al. (2015), não houve diferenças na organização e comparação de coccídios de tiranídeos que são tradicionalmente relacionados (Berto et al., 2011).

Os oocistos da descrição original de *I. ferox* e os de *M. ferox* e *T. Sulphureus*, do presente estudo, divergiram nas medidas. Essas diferenças morfométricas foram observadas principalmente a partir do baixo número de oocistos medidos a partir de hospedeiros únicos *M. ferox*, tanto em Berto et al. (2009a), quanto no presente estudo (**Tabela 1**). Em contraste, os 71 oocistos medidos de 5 *T. sulphureus* atingiram uma ampla gama de medidas, que é compatível

com os maiores e menores oocistos de *M. ferox*. Assim, pode-se concluir que *I. ferox* tem uma ampla gama de medidas detectadas ao se observar oocistos de vários hospedeiros. Essas diferenças no tamanho dos oocistos de diferentes hospedeiros são naturais e já estabelecidas na literatura científica como resultado de fatores biológicos e ecológicos (Duszynski, 1971; Fayer, 1981; Berto; Lopes, 2020).

A rescrição dos fotossíntipos de *I. ferox* propostos no presente estudo baseia-se na observação de oocistos com micrópila (**Figura. 2A, B**), que não foram identificados na descrição original por Berto et al. (2009a). Provavelmente, o baixo número de 10 oocistos observados em Berto et al. (2009a) deve ter favorecido a não observância da micrópila, uma vez que essa característica, é observada apenas em certas posições dos oocistos (**Figura. 2 E-G, I e J**), especialmente quando são subsféricas (Berto et al., 2014).

Assim, esse estudo destaca a importância da descrição de espécies coccidianas de muitos oocistos, evitando que certas características não sejam observadas. Nesse mesmo sentido, a descrição original de Berto et al. (2009a), não identificou oocistos com uma parede áspera. De fato, os oocistos observados no presente estudo apresentaram uma rugosidade baixa a moderada, e em um dos hospedeiros *T. sulphurescens*, apenas os oocistos com rugosidade muito baixa foram predominantemente observados, semelhantes aos fotossíntipos de *I. ferox*. Portanto, esses resultados reforçam que a descrição de novas espécies coccidianas de um único espécime hospedeiro deve ser evitada, garantindo que todos os detalhes possíveis de uma espécie coccidiana sejam observados.

Isoospora ferox é a sexta espécie identificada a partir de aves Suboscines a ter uma deposição de sequência genética COI no GenBank. Mesmo assim, poucas conclusões filogenéticas são observadas a partir do cladograma demonstrado na **Figura 3**. *Isoospora ferox* estava mais próxima de *Isoospora* spp. de turdídeos e traupídeos do que de espécies da mesma parvordem, como *Isoospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020, e Superfamília/Família, como *Isoospora lopesi*. Ao mesmo tempo, *Isoospora ferox* está mais próximo de coccidianos da região neotropical, como *Isoospora massardi*, bem como de espécies coccidianas relacionadas a aves endêmicas na Oceania, como *Isoospora manorinae*.

De fato, o fragmento de 257 pb do gene COI pode não ter sido totalmente adequado para a delimitação de espécies coccidianas de passeriformes, apesar de ter sido pioneiro no trabalho de Dolnik et al. (2009), possuir o maior número de depósitos no GenBank e, até recentemente, ter sido recomendado para estudos filogenéticos (Yang et al., 2015). Nesse sentido, os últimos trabalhos sobre caracterização molecular de coccídios de passeriformes mostraram que sequências mais longas e múltiplos genes são mais conclusivos nas análises filogenéticas (Yang et al., 2021).

Entretanto, a análise molecular confirmou as diferenças já observadas na morfologia dos oocistos de *I. ferox* e *I. lopesi*, uma vez que essas espécies eram genotipicamente diferentes em 9 pares de bases (4,4%) pelas sequências de COI.

Finalmente, com base nas características morfológicas e moleculares descritas acima, *I. ferox* é redescrita no presente estudo, documentando um novo hospedeiro, *T. Sulphurescens*, e uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, além do hospedeiro-tipo *M. Ferox* na Ilha da Marambaia, sudeste do Brasil.

Comitê de Ética

As licenças de coleta de campo foram emitidas pelo SISBIO/ICMBio (licenças 45200-1; 49605-1; 54951-1) e CEUA/UFRRJ (protocolos IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV6606250616). Todas as diretrizes institucionais, nacionais e internacionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTO, B. P., LUZ, H. R., FLAUSINO, W., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 74, 75–80.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., LUZ, H. R., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009b). *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher. *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, 54, 301–304.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., MCINTOSH, D., TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, 80, 159–204.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2013). Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In L. Ruiz; L. Iglesias (Eds.), *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease* (pp. 47–66). New York: **Nova Science Publishers**.
- BERTO, B. P., MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 1–15.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host environment interaction. **Journal of Parasitology**, 106, 707–713.
- DEL HOYO, J.; COLLAR, N. J. (2016). *HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World, Volume 2: Passerines*. Cambridge: Lynx Edicions, Barcelona; **BirdLife International**, 1013 pp.
- DOLNIK, O. V., PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. (2009). Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal of Parasitology**, 95, 169–174.
- DUSZYNSKI, D. W. (1971). Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. **Journal of Parasitology**, 57, 948–952.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336. Fayer, R. (1980). Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. **Veterinary Parasitology**, 6, 75–103.
- ICMBIO. (2016). **Parque Nacional do Itatiaia**. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 13 may 2020.
- PIACENTINI, V. Q., ALEIXO, A., AGNE, C. E., MAURÍCIO, G. N., PACHECO, J. F., BRAVO, G. A., et al. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian ORNITHOLOGICAL RECORDS COMMITTEE/Lista comentada das aves do Brasil pelo

Comite Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 23, 90–298.

RODRIGUES, M. B., SILVA, L. M., LOPES, B. DO B., BERTO, B. P., LUZ, H. R., FERREIRA, I; LOPES, C. W. G. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. **Zootaxa**, 4034, 193–196.

SILVA-CARVALHO, L. M., PASTURA, D. G. N., GOMES, J. V., SIQUEIRA, P. B., RODRIGUES, M. B., LIMA, V. M., et al. (2018). *Isospora lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463.

STOTZ, D. F., FITZPATRICK, J. W., PARKER, T. A., III; MOSKOVITS, D. K. (1996). Neotropical Birds: Ecology and Conservation (p. 478). Chicago: **Universidade de Chicago Press**.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M.; KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24, 1596–1599.

TENTER, A. M., BARTA, J. R., BEVERIDGE, I., DUSZYNSKI, D. W., MEHLHORN, H., MORRISON, D. A., et al. (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, 32, 595–616.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (2008). Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. **Brazilian Journal of Biology**, 68, 913–915.

WILLIAMS, R. B., THEBO, P., MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J. A. (2010). Coccidian oocystas type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76, 69–76.

YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A.; RYAN, U. (2015). *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

YANG, R., BRICE, B., LIU, Q., BERTO, B. P., AUSTEN, J.; RYAN, U. (2021). Morphological and genetic characterization of the first *Isospora* species (*I. lugensae*) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). **Parasitology Research**, 120, 1037–1047.

CAPÍTULO II

Isospora basileuterusi (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PULA-PULA
Basileuterus culicivorus (DEPPE) (PASSERIFORMES: PARULIDAE) NA AMÉRICA
DO SUL

RESUMO

Isospora basileuterusi Mello; Berto, 2021 é descrito com base em material coletado do pula-pula *Basileuterus culicivorus* (Deppe), capturado no Parque Nacional de Itatiaia, uma unidade de conservação no sudeste do Brasil. Os oocistos da nova espécie são elipsoidais a ovoidais, medem, em média, 25,2 x 21,1 µm, apresentam parede lisa e bicamadas, c.1,6 µm de espessura. Micrópila e resíduo do oocisto ausentes, com um a três grânulos polares presentes. Os esporocistos são elipsoidais, em formato de limão, medindo em média 15,3 x 9,5 µm, um corpo Stieda semelhante a botão e um corpo de substieda trapezoidal. O resíduo do esporocisto está presente, geralmente como um corpo de grânulos ligados à membrana. Os esporozoítas são vermiformes, com corpos refráteis. Quatro, dos 19 pula-pulas capturados (21%), estavam positivados pela nova espécie. A análise molecular do gene mitocondrial c oxidase subunit 1 (COI) revelou uma semelhança de 99,5% entre a nova espécie e *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot; Ryan, 2015, de canários da ilha canárias *Serinus canaria* (L.), na Austrália Ocidental. Os oocistos de *I. basileuterusi* podem ser distinguidos dos outros quatro *Isospora* spp. registados em hospedeiros de Parulidae, e das espécies molecularmente mais próximas, pelo esporocisto típico em formato de limão, com pequeno corpo substieda e um resíduo de esporocisto ligado a membrana. Portanto, com base nas características morfológicas e moleculares, *I. basileuterusi* é a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através da sequenciação do gene COI.

Palavras-chave: *Isospora*, Parque Nacional de Itatiaia, molecular.

ABSTRACT

Isospora basileuterusi Mello; Berto, 2021 is described based on material from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) captured in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in south-eastern Brazil. Oocysts of the new species are elipsoidal to ovoidal, measuring on average 25.2 x 21.1 μm , with a suave, bi-layered wall, c.1.6 μm thick. Micropyle and oocyst residuum are both ausente, but one to three polar granules are present. Sporocysts are elipsoidal to lemon-Formad, measuring on average 15.3 x 9.5 μm , with a knob-like Stieda body and a trapezoidal sub-Stieda body. y. Sporocyst residuum is present, usually as a body of membrane-bound granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies. Four of the 19 warblers captured (21%) were infected with the new species. Molecular analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene revealed a similarity of 99.5% between the new species and *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot; Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (L.) in Western Australia. The oocysts of *I. basileuterusi* can be distinguished from the four other *Isospora* spp. recorded in hosts of the Parulidae, and from the molecularly most closely related species, by the typical elipsoidal to lemon-Formad sporocysts, with small sub-Stieda body and a membrane-bound sporocyst residuum. Therefore, based on the morphological and molecular features, *I. basileuterusi* is the fifth species described in a host of the family Parulidae and the first molecularly characterized via sequencing the COI gene.

Keywords: *Isospora*, Itatiaia National Park, molecular.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país da região neotropical com maior número de espécies de aves, apresentando cerca de 1.971 espécies listadas pelo Comitê Nacional de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021), que corresponde à metade da diversidade da avifauna neotropical (Dias, 1992). Em relação às pesquisas sobre aves neotropicais, o estudo de seus parasitas tem sido destacado pela associação com ecologia, biologia e conservação de espécies.

Entre seus parasitas, os protozoários coccídios são importantes como causa de morbidade e mortalidade, especialmente em aves em cativeiro ou ambientes antropizados, atuando assim como biomarcadores ecológicos (Berto; Lopes, 2020).

O pula-pula, *Basileuterus culicivorus* (Deppe) é um pássaro da família Parulidae com ampla distribuição na região neotropical (Sick, 1997; Pacheco et al., 2021). Tem hábitos alimentares insetívoros e forrageia o estrato médio de floresta ombrófila densas (Marini; Cavalcanti, 1993; Lima; Manhães, 2009).

O presente estudo fornece uma descrição e caracterização molecular de uma nova espécie de *Isospora* spp. a partir de pula-pulas *B. culicivorus* capturados no Parque Nacional do Itatiaia, unidade de conservação no sudeste do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Foram realizadas 9 expedições entre 2014 e 2019 no Parque Nacional de Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2021), em agosto (22°26'19"S, 44°37'23"O) e novembro (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2014; Março (22°27'38"S, 44°35' 34"O) 2015; Março (22°19'46"S, 44°32'11"O) e outubro (22°27'38"S, 44°35'34"O) 2016; Julho (22°26'15"S, 44°18'33"O) e novembro (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2017; Agosto (22°26'57.00"S, 44°36' 25.00"O) 2018; Março (22°26'17"S, 44°37' 33"O) 2019. Um total de 19 *B. culicivorus* foram capturados com redes de neblina. As aves foram mantidas em caixas individuais e suas fezes coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação ao nível da espécie, a ave foi fotografada e liberada. As amostras de fezes foram colocadas em tubos de centrifugas contendo 2,5% de solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em 1:6 (v/v).

2.2 Análise Morfológica

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C), por 10 dias, ou até que aproximadamente 70% dos oocistos estivessem esporulados.

Os oocistos foram isolados por flutuação, na solução saturada de açúcar de *Sheather's* (gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014a), as observações morfológicas, desenhos, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), os desenhos de linha foram editados usando dois aplicativos de software (Corel DRAW, e Corel PHOTO-PAINT) do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics

Suite, Versão, 2020; Corel Corporation, Canadá) e todas as medidas estão em micrômetros.

2.3 Geração de dados moleculares

Um oocisto individual, de diluições em série, foi isolado em uma lâmina de microscópio com utilização de micropipeta estéril. O oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até que a clarificação do sobrenadante (Dolnik et al., 2009). O DNA do oocisto foi extraído com o “*Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit*” (Qiagen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA para alcançar a ruptura completa dos oocistos.

Foi realizada uma PCR para a amplificação de um fragmento parcial do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), gene (c.250 bp). Após um nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os *primers* externos COIbF1 (5' -GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') e COIbR1 (5'-CCA AGA AAT ACR AAR TGG AA-3''), produziram um amplicon do tamanho de c.302 bp e os *primers* internos COIbF2 (5' -GGG CAC ATA TGA C-3') e COIbR2 (5' -ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produziram um amplicon de 257 bp.

A reação da PCR continha 12,5 µl de GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs, São Paulo, Brasil) (1x), 0,25 µl de cada *primer* (0,2 µM), 9 µl de água, sem nuclease e 3 µl de DNA (para a reação primária) ou 3 µl produto PCR primário (para a reação secundária).

As amplificações de PCR primárias e secundárias foram realizadas utilizando as mesmas condições de ciclismo: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s, 47°C por 45 s e 72°C por 1 min) e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. Os amplicons da segunda rodada PCR foram purificados utilizando-se a Purificação Qiagen MinElute PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil).

2.4 Análises de sequência de DNA

Todos os amplificadores PCR foram sequenciados usando os *primers* dianteiros e invertidos da PCR pela *Ludwig Biotechnology*, onde um Analisador Genético *ABI-Prism 3500 46* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento pelo método de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados utilizando-se o programa Chromas 2.6. A sequência recém gerada foi comparada com as de *Isospora* spp. e outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). A árvore filogenética foi construída usando a recém-gerada sequência *cox 1* alinhada com sequências para 18 espécies de Isosporídeos disponíveis no GenBank.

Análises de distância e filogenia foram realizadas utilizando-se o MEGA X (Kumar et al., 2018). Resumidamente, os arquivos de cromatografia do sequenciamento pelo método Sanger, foram importados para o MEGA X e as sequências de nucleotídeos foram acuradas, analisadas e alinhadas com sequências de referência do GenBank, utilizando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>).

A história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias computadas utilizando o método “Tamura-Nei” com base na seleção do modelo usando *ModelTest* em MEGA X. As análises de *bootstrap* foram realizadas utilizando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvores inferidas.

3 RESULTADOS

Foram examinados dezenove *B. culicivorus* e quatro (21%) foram positivos para oocistos coccidianos, de um morfotipo não relatado na literatura científica. Estes pula-pulas positivados foram capturados nos meses de novembro de 2014 e agosto de 2018, em uma trilha chamada "Trilha das Borboletas" (22°26'57''S, 44°36'25''O), e em março de 2019 no início da "Travessia Ruy Braga" (22°26'17''S, 44°37'33''O), no Parque Nacional de Itatiaia.

A espécie foi denominada: *Isospora basileuterusi* Mello ; Berto O hospedeiro: *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae), a localidade de obtenção das amostras foi o Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57''S, 44°36'25''O), Brasil, o tipo de material realizado, foram fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução 2,5% de K₂Cr₂O₇ (Williams et al., 2010), depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na coleção de parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P124/2021, as fotografias do espécime hospedeiro (simbiotipo) depositadas na mesma coleção, o sítio do hospedeiro foi desconhecido, a prevalência foi de 21% (4 das 19 aves examinadas).

Uma sequência de COI representativa foi depositada no banco de dados do GenBank sob o número de adesão OM025014. Registro do ZooBank: Para cumprir as normas estabelecidas no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2012) detalhes da nova espécie foram submetidos ao ZooBank. O Identificador de Ciência da Vida (LSID) do artigo é urn:lsid:-zoobank.org:pub:DC2F625C-B798-46DE-84F6-F6883A90E4A5. O LSID para o novo nome *Isospora basileuterusi* Mello ; Berto é urn:lsid:zoobank.org:act:26689BA2-AAC9-4E41-B90E-E40C5934137B. Etimologia: O epíteto específico é derivado do nome do gênero do hospedeiro-tipo.

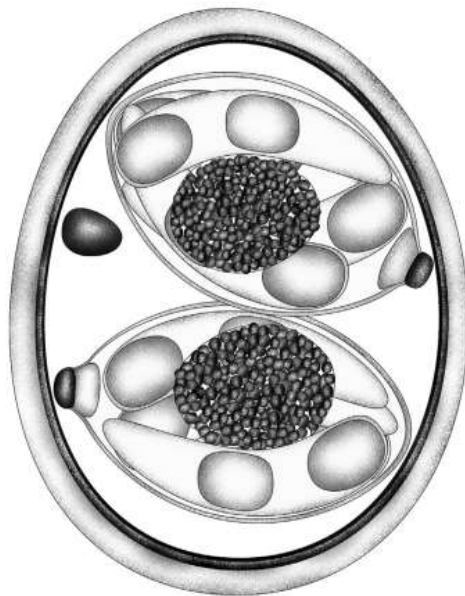


Figura 1. Desenho do oocisto esporulado de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Barra de escala: 10 µm.

3.1 Descrição

Baseada em 25 oocistos e 25 esporocistos; (**Figuras 1 e 2**). Oocistos elipsoidais a ovoidais, 22-28 x 17-23 (25.2 x 21.1); índice morfométrico de 1,1-1,3 (1,20). Parede em camadas, 1,5-1,9 (1.6) de espessura, camada externa lisa. Micrópila e resíduo ausentes, de um a três (geralmente um) grânulos polares presentes, 2.4-3.0 x 1.7-2.4 (2.7 x 2.0). Dois esporocistos, elipsoidais em forma de limão, 14-17 x 8-11 (15,3 x 9,5); Índice morfométrico de 1,4-1,8 (1,61). Corpo de Stieda presente, formato de botão, 0,9-1.1 x 1.7-2.1 (1.0 x 1.8); substieda presente, trapezoidal, 1.1-1.7 x 2.5-2.9 (1.4 x 2.7); corpo de parastieda ausente; esporocistos, resíduo presente, geralmente um distintamente ovoidal a elipsoidal, composto por numerosos grânulos pequenos que parecem ligados à membrana, 4.3-5.2 x 3.5-4.3 (3.9 x 4.8). Quatro esporozoítos, vermiformes, com corpos refráteis anteriores e posteriores e núcleo indiscernível.

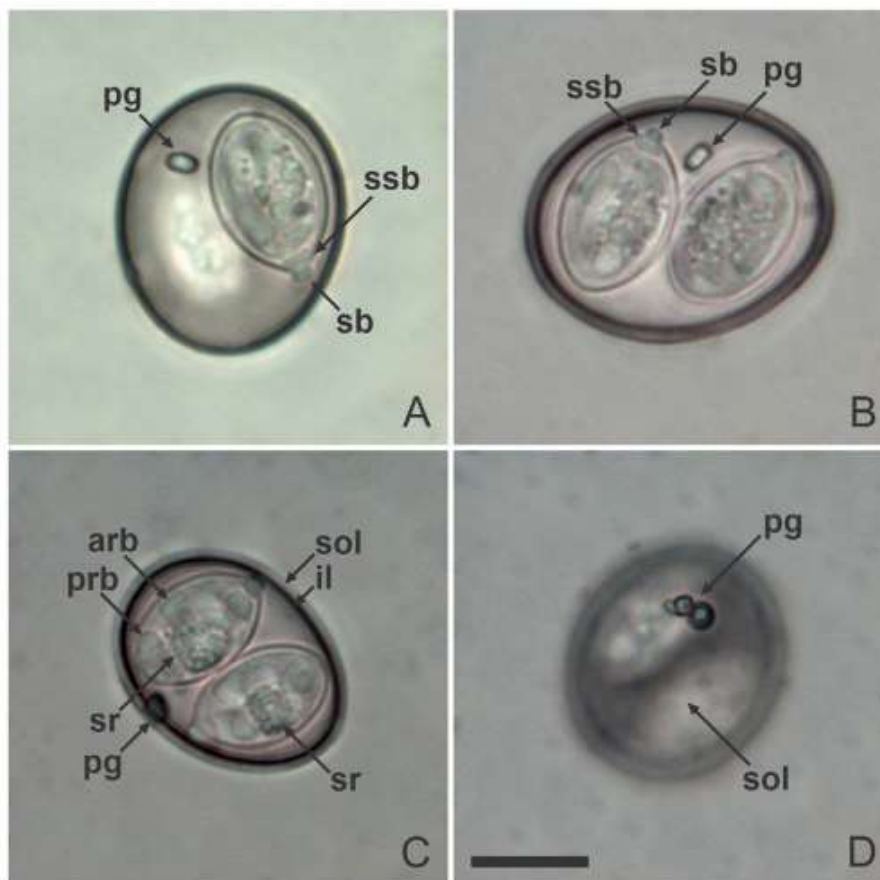


Figura 2. Fotomicrogramas de oocistos esporulados de *Isospora basileuterusi* do pula-pula *Basileuterus culicivorus*. Para observação: camadas interiores (il) e exteriores lisas (sol) da parede ovócito; grânulo polar (pg); Corpos Stieda (sb) e substieda (ssb); resíduo do esporocisto (sr); corpos refráteis posteriores (prb) e anteriores (arb). Todos para a mesma escala. Barra de escala: 10 μ m.

3.2 Observações

Até o momento, quatro *Isospora* spp. são registrados de toutinegras (**Tabelas 1 e 2**). Os tamanhos dos oocistos de todas essas espécies são razoavelmente compatíveis com *I. basileuterusi*; no entanto, estes podem ser facilmente distinguidos por algumas características: a nova espécie é a única com esporocistos elipsoidais em forma de limão, com pequeno corpo

de substieda e resíduo do esporocisto ligado à membrana. Além disso, *I. basileuterusi* não possui as características típicas das outras espécies, como a ausência de grânulos polares em *Isoospora cardellinae* Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velazquez, García-Conejo, Galindo-Sanchez, Janczur ; Soriano-Vargas, 2016 e *Isoospora celata* Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes ; Soriano-Vargas, 2014 (ver Berto et al., 2014b; Salgado-Miranda et al., 2016), a presença de resíduo do oocisto em *I. celata*, o corpo substieda compartimentalizado em *Isoospora orbisreinitas* Keeler, Yabsley, Adams ; Hernandez, 2014 e o corpo substieda grande e trapezoidal em *Isoospora piacobrai* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2010 (Berto et al. (2009); Keeler et al., (2014).

Isoospora basileuterusi também difere morfologicamente da *Isoospora* spp. (**Figura 3**), *Isoospora serinuse* Yang, Brice, Elliot ; Ryan, 2015 e *Isoospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira ; Berto, 2020. Como características principais da nova espécie, são observados esporocistos elipsoidais, em forma de limão, corpo substieda pequeno e membrana ligada ao resíduo do esporocisto, não observadas em *I. serinuse* e *I. oliveirai*.

3.3 Análise filogenética

A amplificação de DNA do oocisto de *I. basileuterusi* mostrou uma faixa clara de c.250 bp. A análise filogenética incluiu 18 sequências para *Isoospora* aviária disponível no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi usado como grupo externo. *Isoospora basileuterusi* está em um clado com a maior semelhança a *I. serinuse* (99,5%), dos canários da ilha Serinus canaria (L.) na Austrália Ocidental (Yang et al., 2015). Ademais, *I. basileuterusi* está intimamente relacionada (95-97%) a *I. oliveirai* do Flautim *Schiffornis virescens* (Lafresnaye) no sudeste do Brasil e *Isoospora* spp., encontrado de turdídeos (Turdidae) e tetras (Paridae) na República Tcheca (Trefancova; Kvicerova, 2019; Ortúzar-Ferreira et al., 2020).

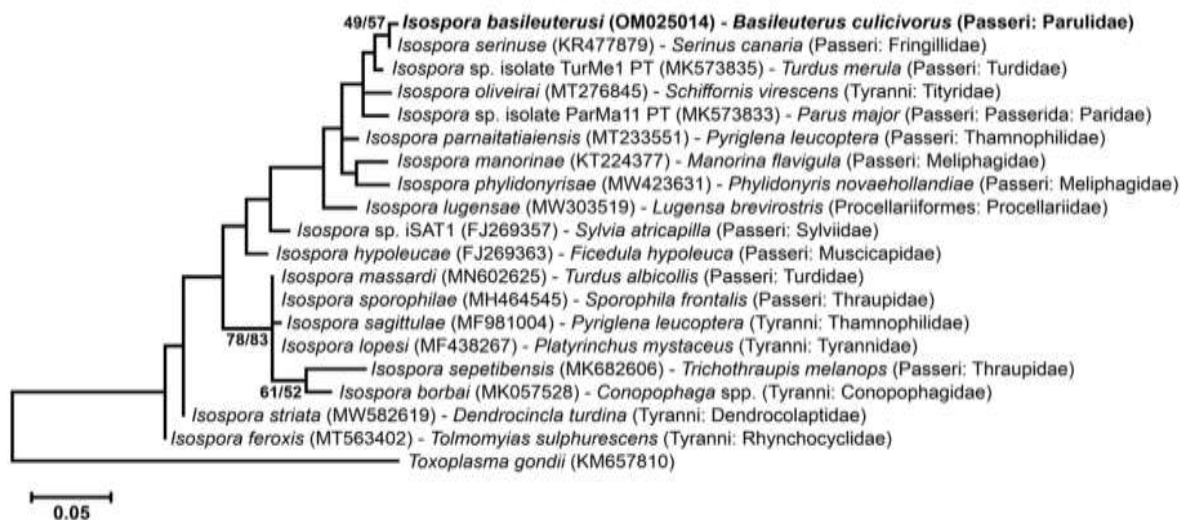


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança para *Isoospora* spp., estimada a partir das sequências cox1. Os números nos nós representam o suporte ao bootstrap (1.000 replicações; apenas os valores > 50% mostrados) para “Neighbor-Joining” e “Maximum Likelihood”, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

Tabela 1. Dados morfológicos comparativos para oocistos de *Isospora* spp. registrados de toutinegras (Parulidae).

Espécie	Hospedeiro	Oocisto							Referências
		Formato	Tamanho	Índice de forma	Grânulo Polar	Resíduo do oocisto	Parede	Micrópila	
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello; Berto	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	elipsoidal a ovoidal	22–28 × 17–23 (25.2 × 21.1)	1.1–1.3 (1.20)	presente, 1–3 (usualmente um)	ausente	1.5–1.9 (1.6)	ausente	Presente estudo
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur; Soriano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson, 1827)	subsférico	23–28 × 23–27 (26.6 × 25.4)	1.0–1.1 (1.1)	ausente	ausente	1.2–1.4 (1.3)	ausente	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes; Soriano-Vargas, 2014	<i>Leiothlypis celata</i> (Say, 1823)	subsférico	27–30 × 25–28 (28 × 26)	1.0–1.1 (1.1)	ausente	presente	1.0–1.3 (1.2)	ausente	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbisreinitas</i> Keeler, Yabsley, Adams; Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson, 1838)	subsférico a ovoidal	21–28 × 19–25 (24.3 × 22.3)	1.0–1.3 (1.0)	Ausente ou presente, 0–4	ausente	–	ausente	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobrai</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin, 1789)	subsférico a ovoidal	21–26 × 20–24 (23.5 × 21.6)	1.1–1.1 (1.1)	presente, 1	ausente	–	ausente	Berto et al. (2009)

Tabela 2. Dados morfológicos comparativos para esporocistos de *Isospora* spp. registrados de toutinegras (Parulidae).

Espécie	Hospedeiro	Esporocisto						Referências
		Formato	Tamanho	Índice de forma	Corpo de Stieda	Corpo de substieda	Resíduo do esporocisto	
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello; Berto	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	Elipsoidal à forma de limão	14–17 × 8–11 (15.3 × 9.5)	1.4–1.8 (1.61)	presente, semelhante a um botão, 0.9–1.1 × 1.7–2.1 (1.0 × 1.8)	presente, trapezoidal, 1.1–1.7 × 2.5–2.9 (1.4 × 2.7)	grânulos ligados por membrana	presente estudo
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur; Soriano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson, 1827)	Ovoidal	18–20 × 11–13 (19.0 × 12.0)	1.6–1.8 (1.7)	presente, semelhante a um botão, (1.1 × 2.4)	presente, trapezoidal à arredondado, às vezes com base irregular, (1.8 × 4.5)	Esférulas espalhadas	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes; Soriano-Vargas, 2014	<i>Leiothlypis celata</i> (Say, 1823)	Ovoidal	15–20 × 11–14 (18 × 13)	1.4–1.5 (1.4)	presente, semelhante a um botão, (1.0 × 2.5)	presente, irregular, quase imperceptível, (1.5 × 4.0)	Esférulas espalhadas	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbisreinitas</i> Keeler, Yabsley, Adams; Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson, 1838)	Ovoidal	12–19 × 10–14 (16.0 × 11.8)	1.0–1.9 (1.4)	presente, semelhante a um botão	presente, proeminente, trapezoidal e compartimentado	muitos grânulos difundidos	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobrai</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin, 1789)	Ovoidal	15–17 × 9–12 (15.8 × 10.5)	1.4–1.6 (1.5)	present, em forma de botão e proeminente, (1.0 × 1.7)	presente, grande, trapezoidal e homogêneo, (2.3 × 4.8)	grânulos de diferentes tamanhos	Berto et al. (2009)

4 DISCUSSÃO

Duszynski; Wilber (1997) compilaram quase todos os estudos taxonômicos de coccídios de Passeriformes. Aconselharam que novas identificações de coccídios devem ser baseadas em morfologia comparativa entre espécies coccidianas registradas na mesma família hospedeira. Nesse sentido, o morfotipo observado a partir dos pula-pula *I. basileuterusi*, neste estudo, foi comparado com as quatro espécies coccidianas registradas da família Parulidae, como mostrado nas **Tabelas 1 e 2**.

Isospora basileuterusi difere em várias características, mas pode ser principalmente diferenciada de outros coccídios pela forma típica de limão de seus esporocistos. O hospedeiro da nova espécie coccidiana descrita aqui, o pula-pula *B. culicivorus*, possui ampla distribuição na região neotropical, do México ao sul da América do Sul (Pacheco et al., 2021). No entanto, de acordo com a BirdLife International (2021), esta espécie é o pula-pula coroadado com listras, que está restrito ao México e à América Central, não ocorrendo no Brasil. Essa desinformação se deve ao status de espécie/subespécie dentro do gênero *Basileuterus Cabanis*. A BirdLife International (2021), reclassificou algumas subespécies de *B. Culicivorus* ao nível da espécie, como *Basileuterus culicivorus auricapilla* (Swainson, 1838), que foi reclassificada ao nível da espécie, como *Basileuterus auricapilla* Swainson, 1838.

Portanto, este estudo seguiu o nome listado pelo Comitê Nacional de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021); cumpre ressaltar que o espécime de aves neste estudo é identificado como *B. auricapilla* pela BirdLife International (2021). De qualquer forma, independentemente da identificação específica dentro de *Basileuterus*, devido às amplas distribuições geográficas de pula-pula (Parulidae) nas Américas, suas espécies coccidianas devem ser igualmente distribuídas por toda a região neotropical.

No presente estudo, a identificação molecular de *I. basileuterusi* foi realizada utilizando-se o gene COI, que é considerado o gene com maior resolução na detecção de eventos de especiação recentes (Barta, 2001; Ogedengbe et al., 2011). Na verdade, a sequência genética de 250 bp COI não foi 100% semelhante a qualquer outra depositada no GenBank, ao contrário do que ocorre com sequências genéticas ribossômicas que são mais conservadas e mais adequadas para estudos filogenéticos de famílias e ordens (Genovez-Oliveira et al., 2020). Por outro lado, a região do COI sequenciada para *I. basileuterusi* não apresentou resultados conclusivos relacionados à ancestralidade, como vinculado à família hospedeira, região biogeográfica, morfologia, biologia da espécie coccidiana, etc. (**Figura 3**). Observou-se também que a amostra de DNA de *Isospora* spp. amplificada e sequenciada com os *primers* (Dolnik et al., 2009) utilizados no presente estudo, são exclusivamente incluídos na filogenia, como nos estudos de Yang et al. (2015) e Silva-Carvalho et al. (2018).

Talvez, a pequena sequência de apenas 250 bp não permitisse maior resolução no estudo filogenético; neste caso, sequências com mais de 600 bp de outras regiões do gene COI, como as geradas pela cartilha JAV (Genovez-Oliveira et al., 2020), apresentariam melhores estimativas filogenéticas no futuro. Infelizmente, no presente estudo, esses *primers* JAV não tiveram sucesso na amplificação das amostras; no entanto, tem sido demonstrado em qualquer caso, que genes mitocondriais, como o COI, são mais adequados para trabalhar com oocistos individuais, pois o número de cópias de DNA mitocondrial é muito maior do que o número de cópias de DNA nuclear, favorecendo assim a amplificação de genes mitocondriais (Dolnik et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

A comparação de *I. basileuterusi* com *Isospora* spp. descritas a partir de pula-pulas neotropicais apoia claramente a designação como uma espécie única. Portanto, *I. basileuterusi* é considerada como nova espécie para a ciência, sendo a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através do sequenciamento do gene COI.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTA, J.R., 2001. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Vet. Parasitol.* 101, 175–186. Berto, B.P., Luz, H.R., Flausino, W., Ferreira, I., Lopes, C.W.G., 2010. *Isospora piacobrai* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the masked yellowthroat *Geothlypis aequinoctialis* (Gmelin) (Passeriformes: Parulidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 75, 225–230.
- BERTO, B.P., MCINTOSH, D., LOPES, C.W.G., 2014a. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista brasileira de Parasitologia**. *Vet.* 23, 1–15.
- BERTO, B.P., MEDINA, J.P., SALGADO-MIRANDA, C., GARCÍA-CONEJO, M., JANCZUR, M.K., LOPES, C.W.G., SORIANO-VARGAS, E., 2014b. *Isospora celata* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the orange-crowned warbler *Oreothlypis celata* (Say) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. **Systematic Parasitology**, 89, 253–257.
- BERTO, B.P., LOPES, C.W.G., 2020. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *J. Parasitol.* 106, 707–713. **BirdLife International**, 2021. IUCN Red List for birds. Available from: <http://www.birdlife.org> (Accessed 22 December 2021).
- DIAS, B.F.S., 1992. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos Recursos Naturais Renováveis. Fundação **Pro-Natureza**, Brasília.
- DOLNIK, O.V., PALINAUSKAS, V., BENSCH, S., 2009. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal Parasitology**, 95, 169–174.
- DUSZYNSKI, D., WILBER, P., 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal Parasitology**, 83, 333–336.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M., et al., 2020. Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. **Parasitology International**. 75, 102040.
- ICMBIO, 2021. Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. (Accessed 22 December 2021). 57 ICZN, 2012. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin Zoological Nomenclature**. 69, 161–169.
- KEELER, S.P., YABSLEY, M.J., ADAMS, H.C., HERNANDEZ, S.M., 2014. A novel *Isospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from warblers (Passeriformes: Parulidae) of Costa Rica. **Journal Parasitology**, 100, 302–304.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and**

- Evolution**, 35, 1547– 1549. Lima, A.L.D.C., Manhães, M.A., 2009. Hábitos alimentares de *Basileuterus culicivorus* (Aves: Parulidae) em uma área de Mata Atlântica secundária, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, 9, 137–143.
- MARINI, M.A., CAVALCANTI, R.B., 1993. Habitat and foraging substrate use of three *Basileuterus* warblers from central Brazil. **Ornitología Neotropical**, 4, 69–76.
- OGEDENGBE, J.D., HANNER, R.H., BARTA, J.R., 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **Internacional Journal Parasitology** . 41, 843–850.
- ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., MELLO, E.R., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A.A., et al., 2020. *Isospora oliveirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. **Acta Parasitologica**. 65, 843–851.
- PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A., AGNE, C.E., BENCKE, G.A., BRAVO, G.A., et al., 2021. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. **Ornithology Research**, 29, 94–105.
- SALGADO-MIRANDA, C., MEDINA, J.P., ZEPEDA-VELAZQUEZ, A.P., GARCÍA-CONEJO, M., GALINDO SANCHEZ, K.P., JANCZUR, M.K., SORIANO-VARGAS, E., 2016. *Isospora cardellinae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red warbler *Cardellina rubra* (Swainson) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. **Systematic Parasitology**, 93, 825–830.
- SICK, H., 1997. **Ornitologia brasileira**. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G.N., GOMES, J.V., SIQUEIRA, P.B., RODRIGUES, M.B., LIMA, V.M., BERTO, B.P., 2018. *Isospora lopesi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463. 58
- TREFANCOVA, A., KVICEROVA, J., 2019. *Isospora svecica* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of coccidium from the white-spotted bluethroat *Luscinia svecica cyanecula* (Aves: Passeriformes: Muscicapidae). **Parasitology Resource**. 118, 3043–3051.
- WILLIAMS, R.B., THEBO, P., MARSHALL, R.N., MARSHALL, J.A., 2010. Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**. 76, 69–76.
- YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A., RYAN, U., 2015. *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

CAPÍTULO III

***Isospora leptopogoni* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DO PAPA-MOSCAS
Leptopogon amaurocephalus, Tschudi, 1846 (PASSERIFORMES:
RHYNCHOCYCLIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

RESUMO

As espécies de protozoários coccidianos registadas a partir de muscicapídeos são poucas, mas foram descritas com uma certa frequência nos últimos anos. Neste contexto, o presente estudo descreve um novo *Isospora* sp. de papa-moscas *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846, capturados no Parque Nacional Itatiaia, em uma área de reflorestamento que fica a cerca de 60 km dos limites do parque, além de fornecer uma identificação molecular através da sequenciação do gene citocromo mitocondrial c 1 oxidase. *Isospora leptopogoni* tem oocistos subsferoidais a ovoidal, medindo em média 22,0 x 19,7 µm, com uma parede lisa, bicamada, c.1,7 µm de espessura. A micrópila é delicada a discreta. O resíduo do oocisto é ausente, com um a três grânulos polares presentes. O esporocisto é em formato de limão, medindo em média 14,7 x 9,3 µm, com um corpo de Stieda semelhante a botão e um corpo substieda retangular a arredondado. O resíduo do esporocisto está presente, é constituído por grânulos compactos delimitados. Os esporozoítas são vermiformes, com corpos refráteis e núcleos. *Isospora leptopogoni* difere de outras *Isospora* spp., principalmente devido aos seus esporocistos em forma de limão, a presença de micrópila e detalhes de Stieda e corpo de substieda. A análise filogenética demonstrou *I. leptopogoni* perto de outra *Isospora* spp. registada a partir de hospedeiros filogeneticamente relacionados e da mesma região biogeográfica. Por fim, a constatação recorrente desta espécie coccidiana no mesmo espécime *L. Amaurocephalus*, numa localidade específica no Parque Nacional da Itatiaia, sugere que a dispersão de *I. leptopogoni* necessita de transmissões contínuas entre Passeriformes suscetíveis, uma vez que a área de movimento de cada espécime de *L. amaurocephalus* aparenta ser pequena.

Palavras-chave: muscicapídeos, *Isospora*, Parque Nacional Itatiaia.

ABSTRACT

Coccidian protozoan species recorded from flycatchers are few, but they have been described with a certain frequency in recent years. In this context, the present study describes a new *Isospora* sp. from sepia-capped flycatchers *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 captured in the Itatiaia National Park and in a reforestation area which is about 60 km away from the park boundaries, in addition to providing a molecular identification via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. *Isospora leptopogoni* has oöcysts that are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 22.0 x 19.7 µm, with a suave, bilayered wall, c.1.7 µm thick. The micropyle is delicate or inconspicuous. Oöcyst residuum is ausente, but one to three polar granules are present. Sporocysts are lemon-Formad, measuring on average 14.7 x 9.3 µm, with a knob-like Stieda body and a rectangular to rounded sub-Stieda body. Sporocyst residuum is present, consisting of compactly bounded granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies and nucleus. *Isospora leptopogoni* is different from other *Isospora* spp. mainly due to its lemon-Formad sporocysts, the presence of micropyle and details of Stieda and sub-Stieda bodies. Phylogenetic analysis placed *I. leptopogoni* close to other *Isospora* spp. recorded from phylogenetically related hosts and from the same biogeographic region. Finally, the recurrent finding of this coccidian species in the same *L. amaurocephalus* specimen in a specific locality in the Itatiaia National Park suggests that the dispersion of *I. leptopogoni* needs continuous transmissions between susceptible passerines as the area of movement of each *L. amaurocephalus* specimen appears to be quite small.

Keywords: muscicapídeos, *Isospora*, Parque Nacional Itatiaia.

1 INTRODUÇÃO

A Parvordem Tyrannida é composta por 320 espécies de Passeriformes distribuídas em 10 famílias diferentes no Brasil: Pipridae, Cotingidae, Tityridae, Oxyruncidae, Onychorhynchidae, Pipritidae, Platyrinchidae, Tachurisi-dae, Rhynchocyclidae e Tyrannidae (Pacheco et al., 2021). Além do Brasil, a distribuição geográfica dessa Parvordem se estende por toda a América, porém, são mais predominantes na Região Neotropical (BirdLife International, 2022).

Leptopogon amaurocephalus Tschudi é um Passeriforme, Rhynchocyclid, comumente nomeado como papa-moscas no Brasil (Pacheco et al., 2021). Esta espécie ocorre em quase toda a região neotropical, tanto em lados cis como transandina. No Brasil é observado principalmente no bioma Mata Atlântica, nas regiões Sul e Sudeste (BirdLife International, 2022). Vive sozinho ou em pares, forrageando videiras e galhos finos em áreas expostas da parte interna da floresta (SICK, 1997). Por viver afastado do solo e ter hábito alimentar insetívoro, é menos predisposto a enteroparasitas de transmissão fecal-oral (Dolnik et al., 2010). Há um relato de enteroparasitismo por protozoário coccidiano (Lopes et al., 2013).

Os coccídios compreendem muitos gêneros e espécies de parasitas de animais domésticos e silvestres, causando morbidade e mortalidade principalmente em condições de desequilíbrio entre hospedeiro e meio ambiente (Berto; Lopes, 2020). Algumas espécies coccidianas de Tyrannida, são registradas das famílias Cotingidae, Tityridae, Platyrinchidae, Rhynchocyclidae e Tyrannidae.

Nesse contexto, o presente estudo fornece uma descrição e identificação molecular de uma nova espécie de *Isohora* a partir de papa-moscas *L. amaurocephalus* capturados em diferentes localidades da região de Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas de amostras

Foram realizadas nove expedições em duas localidades diferentes da Região de Médio Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, que estão a cerca de 60 km uma da outra: (1) Parque Nacional de Itatiaia, unidade de conservação federal brasileira de alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2022); e (2) uma área de reflorestamento de 37 ha, dentro do campus Pinheiral do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ, que é identificado como Espaço Ecológico Educativo – EEcoE de Pinheiral, no Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.

Oito expedições foram realizadas, em novembro (22°26'57"S, 44°36'25"O) e dezembro (22°27'20"S, 44°36'28"O) 2014, março (22°27'40"S, 44°35'32"O) e abril (22°27'52"S, 44°36'26"O) 2015, outubro (22°27'40"S, 44°35'32"O) 2016, junho (22°27'40"S, 44°36'51" O) e novembro (22°26'57"S, 44°36'25"O) 2017, e agosto (22°26'57"S, 44°36'25"O) 2018, no Parque Nacional de Itatiaia.

A última expedição foi realizada em janeiro (22°31'37"S, 43°59'45"O) 2019, no EEcoE/IFRJ.

Redes de neblina foram usadas para a captura dos pássaros.

Onze papa-moscas *L. amaurocephalus*, no Parque Nacional de Itatiaia e um no EEcoE/IFRJ, foram capturados. As aves foram identificadas especificamente (Ridgely et al., 2015), fotografadas e agrupadas com anilhas de metal, numeradas, fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação (CEMAVE). Posteriormente, as aves foram mantidas em

caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, sendo soltas no mesmo local de captura.

Gotículas frescas de fezes (c.0,1 g), de cada pássaro, foram colocadas, individualmente, em um tubo de centrífuga com um dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) solução (Dolnik, 2006).

2.2 Análise Morfológicas

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram incubadas nos tubos de centrífugas, e regularmente oxigenadas por movimento mecânico, em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, por 7 dias. Os oocistos foram recuperados pelo método de Sheather's e identificados microscopicamente de acordo com Duszynski; Wilber (1997) e Berto et al. (2014). As observações morfológicas, desenhos, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binóculo Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Os desenhos foram editados usando dois aplicativos de software (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 2020, Corel Corporation, Ontario, Canadá). Todas as medidas estão em micrômetros.

2.3 Análise Moleculares

Um único oocisto da amostra foi isolado, após diluições seriadas, em gotas sobre uma lâmina de microscópio, utilizando-se uma micropipeta estéril. O oocisto isolado foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação até que o sobrenadante clarificar (Dolnik et al., 2009).

O DNA foi extraído do oocisto utilizando o Kit *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, São Paulo, Brazil) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA, a fim de alcançar a ruptura completa dos oocistos.

A amplificação, via PCR, de um fragmento parcial do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) (c.250 bp) foi realizada utilizando o nested PCR, como descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os amplicons do nested PCR foram purificados utilizando a Purificação PCR Qiagen MinElute (Qiagen, São Paulo, Brasil).

2.4 Análises de sequência de DNA

Após o nested PCR, os amplicons foram sequenciados utilizando um Analisador Genético *ABI-Prism 3500* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia). A sequência recém gerada foi comparada com as de *Isopora* spp. Disponível no banco de dados do GenBank usando a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

A árvore filogenética foi construída usando a recém gerada sequência de COI, alinhada com *Isopora* spp., disponível no GenBank.

O alinhamento, análises de distância e filogenias foram realizados utilizando *Clustal W* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) em MEGA X (Kumar et al., 2018).

A história evolutiva foi inferida usando os métodos “Neighbor-Joining” (NJ) e “Maximum Likelihood” (ML) e as distâncias computadas utilizando o método “Tamura-Nei”, com base na seleção de modelos utilizando *ModelTest* em MEGA X.

As análises de *bootstrap* foram realizadas usando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade de topologias de árvores inferidas.

3 RESULTADOS

Nove (84%), dos onze papa-moscas *L. amaurocephalus*, capturados no Parque Nacional do Itatiaia testaram positivo para oocistos coccidianos. O papa-moscas capturado no EEcoE/IFRJ também foi positivo. Os oocistos possuem um morfotipo distinto daquelas espécies coccidianas registradas como parasitas de Tyrannida.

A descrição da amostra é da Família Eimeriidae Minchin, 1903, o gênero *Isospora* Schneider, 1881, a espécie denominada *Isospora leptopogoni* Melo; Berto O hospedeiro *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi (Passeriformes: Tyranni: Tyrannides: Tyrannida: Rhynchocyclidae: Pipromorphinae), papa-moscas. Localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22°27'20"S, 44°36'28"O), sudeste do Brasil. Outra localidade: Espaço Ecológico Educativo (22°31'37"S, 43°59'45"O), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, campus Pinheiral, sudeste do Brasil.

Fotomicrografias, desenhos de linha e oocistos em solução 2,5% de K₂Cr₂O₇ (Williams et al., 2010) estão depositados e disponíveis em (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) e na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P-124/2021. As fotografias do espécime hospedeiro (simbiotipo) são depositadas na mesma coleção. Sítio do hospedeiro: Desconhecido. Prevalência: 84% (10 das 12 aves examinadas).

Uma sequência de COI representativa foi depositada no banco de dados do GenBank sob o número de adesão OM568833. Registro do ZooBank: Para cumprir as normas estabelecidas no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2012) detalhes da nova espécie foram submetidos ao ZooBank.

O Identificador de Ciência da Vida (LSID) do artigo é is urn:lsid:zoobank.org:pub:3E3A9902-B7AE-407E-89AA8A4624080B49. O LSID para o novo nome *Isospora leptopogoni* Melo ; Berto is urn:lsid:zoobank.org:act:14DAD073-D779-4762-A92AAB88F5D6D253.

Etimologia: O epíteto específico é derivado do nome do gênero do tipo-hospedeiro.

3.1 Descrição

Oocisto (n = 63), formato subesferoidal a ovoidal, 19–25 x 18–23 (22,0 x 19,7); índice morfométrico de 1,0–1,3 (1,12). Parede bicamadas, 1,5–1,9 (1,7) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Micrópila delicada ou discreta, 2,3–5,0 (3,8) de largura. Resíduo do oocisto ausente, 1–3 grânulos polares presentes. Esporocisto em forma de limão, 12–17 x 8–11 (14,7 x 9,3); índice morfométrico de 1,3–1,8 (1,58). Corpo de Stieda presente, semelhante a um botão, 0,9–1,3 de altura x 1,6–2,2 de largura (1,1 x 1,8). Corpo substieda presente, retangular a arredondado, 1,3–2,2 de altura x 1,4–2,8 de largura (1,6 x 2,1). Corpo de parastieda ausente. Resíduo do esporocisto presente, constituído por grânulos compactos delimitados. 4.1–7.3 x 3.7–6.8 (5.6 x 5.1). Esporozoítos vermiformes, com corpos refratários anteriores e posteriores e núcleo central. (**Figuras 1, 2A–F**).

3.2 Análise filogenética

A amplificação do DNA do oocisto de *I. leptopogoni* apresentou uma banda clara de c.250 pb. As sequências de dois oocistos individuais de duas amostras de aves diferentes, foram obtidas e foram 100% idênticas entre si. A análise filogenética incluiu 25 sequências para *Isospora* spp. disponíveis no GenBank (**Figura 3**). *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1908) foi usado como o grupo externo.

Isospora leptopogoni foi demonstrado em um pequeno grupo monofilético com

Isospora borbai Silva-Carvalho; Berto, 2019, *Isospora lopesi* Silva-Carvalho; Berto, 2018 e *Isospora sagittulae* McQuiston e Capparella, 1992, que também são parasitas de suboscines passerines (Tyranni) da Região Neotropical (Silva-Carvalho et al., 2018a, 2018b, 2019).

O grupo destes três coccídios de suboscinas, foi incluído dentro de um clado maior com *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira ; Lopes, 2014, *Isospora sporophilae* CarvalhoFilho, Meireles, Ribeiro ; Lopes, 2005, *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2008 e *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira ; Lopes, 2010, que também são parasitas de Passeriformes da Região Neotropical, embora sejam oscinas Passeriformes (Rodrigues et al., 2019, Genovez-Oliveira et al., 2019, 2020). Todos esses *Isospora* spp. apresentaram a maior similaridade de 99% com *I. leptopogoni*.

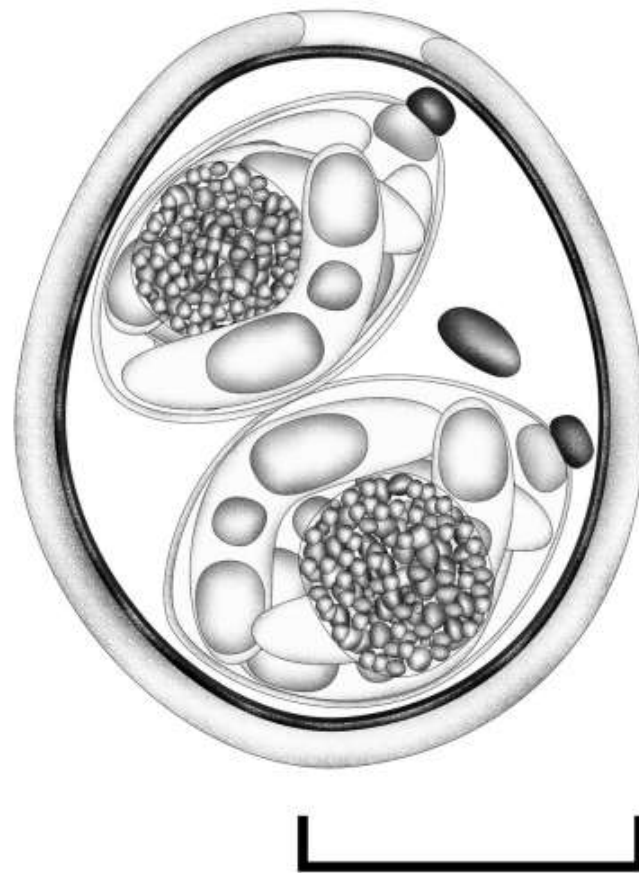


Figura 1. Desenho de linha do oocisto esporulado de *Isospora leptopogoni* de papa-moscas, na América do Sul. Barra de escala: 10 μ m.

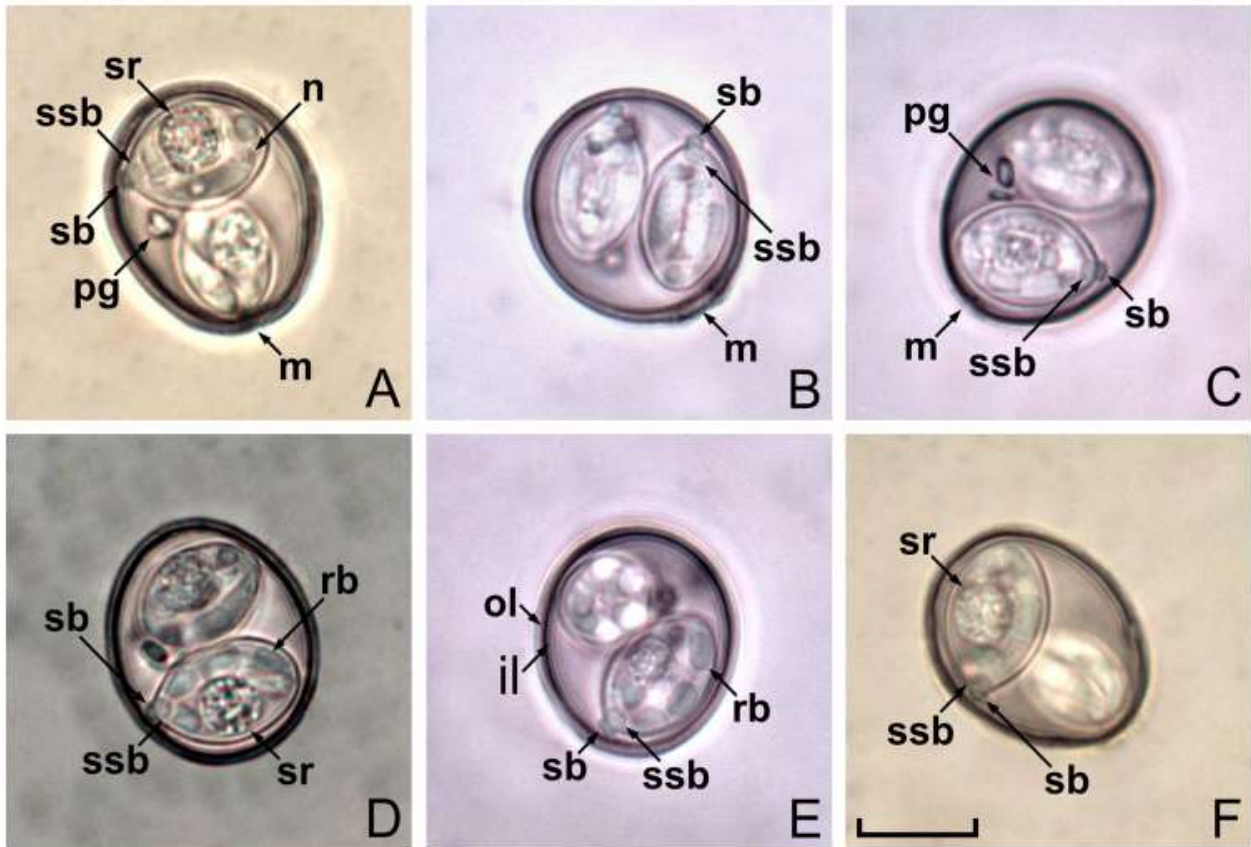


Figura 2. Fotomicrografias de *Isospora leptopogoni* recuperadas de papa-moscas na América do Sul. Observe a camada interna (il) e externa lisa (sol) da parede do cisto oo, micrópila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refratário (rb), resíduo de esporocisto (sr) e corpo de Stieda (sb) e sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 μ m.

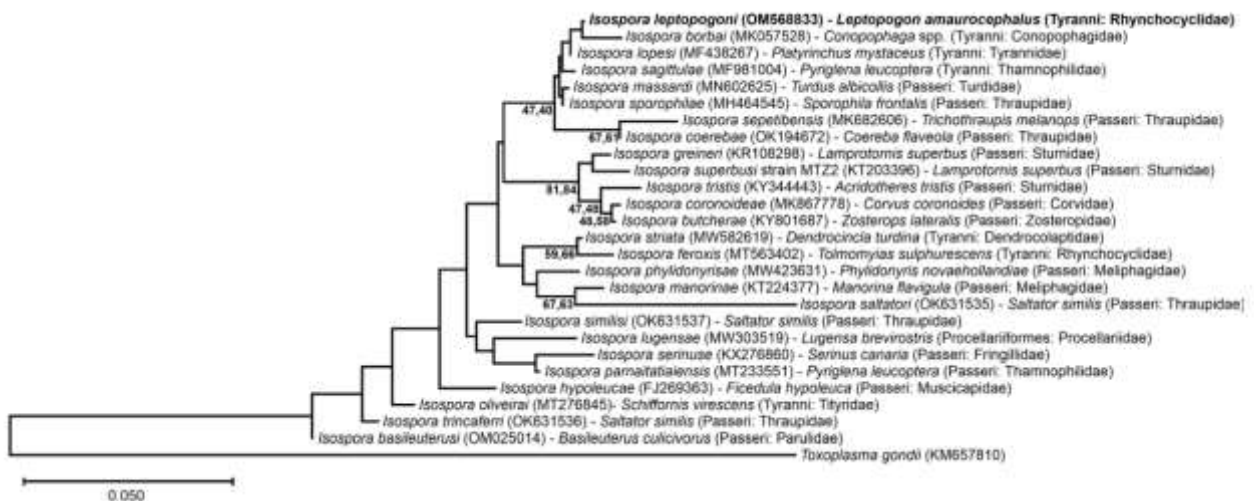


Figura 3. Árvore pelo método de “Neighbor-Joining” estimada a partir das sequências gênicas COI de espécies de *Isospora*. Bootstrap a 1.000 replicações (>40%) para “Neighbor-Joining” (NJ) e “Máxima verossimilhança” (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

4 DISCUSSÃO

Desde a revisão taxonômica de coccidia de aves passeriformes do Novo Mundo, por Berto et al. (2011), que se baseia nas diretrizes de Duszynski; Wilber (1997), relatos e descrições de coccidia passeriformes têm sido estudados e registrados de acordo com a família hospedeira passeriforme. No entanto, existe atualmente uma inconsistência na taxonomia do Aves quando se comparam diferentes fontes bibliográficas, mesmo que atualizadas. Neste caso, a BirdLife International (2022) classifica *L. amaurocephalus* como Tyrannidae, enquanto o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Pacheco et al., 2021) considera várias famílias menores organizadas em parvordens, superfamílias e subfamílias, derivadas da grande família tradicional Tyrannidae.

Como o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos é a principal fonte bibliográfica de taxonomia de Aves no Brasil e estabelece mais grupos de classificação facilitando a delimitação de hospedeiros passeriformes filogeneticamente mais próximos e distantes, esta classificação foi utilizada para este estudo.

Dos Rhynchocyclidae, que é a família de *L. amaurocephalus*, apenas duas espécies coccidianas são registradas; portanto, este estudo comparou os oocistos obtidos de *L. amaurocephalus* com *Isospora* spp. registrados de passeriformes da parvordem Tyrannida. Das dez famílias observadas em Tyrannida, apenas cinco têm espécies coccidianas registradas, como mostra a (**Tabela 1**). *Isospora leptopogoni* pode ser facilmente distinguido dos seis *Isospora* spp. registrados de Tyrannida pelo esporocisto em forma de limão, e corpo de Stieda semelhante a um botão e corpo de substieda retangular a arredondada. Além disso, é o único desses *Isospora* spp. a apresentar oocistos lisos com uma micrópila delicada ou discreta (**Tabela 1**). Um *L. amaurocephalus* capturado em novembro de 2017, em uma trilha denominada “Trilha das Borboletas” (22°26'57"S, 44°36'25"O), no Parque Nacional do Itatiaia, foi recapturado nove meses depois, em agosto de 2018, na mesma localidade. Este cabeçudo foi cercado com o anel numérico 'C114236' (CEMAVE).

Ambas as amostras coletadas em 2017 e 2018 foram positivas para *I. leptopogoni*, mas com baixas densidades de 81 e 74 oocistos por gota fecal, respectivamente (Dolnik, 2006). Este achado sugere que os espécimes de *L. amaurocephalus* não se movem por longas distâncias individualmente, sendo provavelmente restritos a pequenas áreas de movimento. Nesse pensamento, a dispersão de *I. leptopogoni* depende de transmissões frequentes entre espécimes de *L. amaurocephalus* ou outras espécies hospedeiras, suscetíveis, que estão distribuídas na região de Médio Paraíba onde este estudo foi desenvolvido, uma vez que a dispersão de coccidia por um único espécime seria bastante restrita a pequenas áreas.

Cumprе ressaltar, ainda, que as baixas densidades e a ausência de sinais clínicos observados neste espécime 'C114236', em diferentes momentos, é compatível com o bom estado de conservação do Parque Nacional do Itatiaia (Berto; Lopes, 2020).

O *primer* utilizado para amplificar e sequenciar a região gênica de *250 pb de COI neste estudo tem sido considerado inadequado para estudos filogenéticos, embora esteja sendo razoavelmente apropriado para a delimitação de *Isospora* spp. de passeriformes até então (Genovez-Oliveira et al., 2020; Maronezi et al., 2022; Mello et al., 2022). Ou seja, apesar de algumas sequências de *Isospora* spp. de Passeriformes serem 100% idênticas entre si para essa mesma região gênica quando analisadas pelo BLAST, *I. leptopogoni* não foi 100% idêntica a nenhuma sequência depositada no GenBank.

Na análise filogenética (Figura 3), a sequência de *I. leptopogoni* esteve próxima a espécies coccidianas de passeriformes filogeneticamente próximos e da mesma região biogeográfica; embora outros *Isospora* spp. também de Passeriformes filogeneticamente relacionados, como *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009a, 2009b, estivessem distantes na análise filogenética.

Tabela 1. Morfologia comparada de *Isospora* spp., registrada em aves Tyrannida.

Espécies	Hospedeiro	Referência	Oocisto					
			Forma	Tamanho (µm)	L/W ratio	Grânulo polar	Parede	Micrópila
<i>Isospora araponga</i> Doležalová, Torres, Fernández; Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	subesferoidal to elipsoidal	17–22 × 14–16 (19 × 15)	1.1–1.4 (1.3)	1–3	suave	ausente
<i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	subesferoidal	18–20 × 17–20 (19 × 18)	1.0–1.1 (1.1)	geralmente 2	baixa rugosidade	ausente ¹
	<i>M. ferox</i> (Tyrannidae: Tyranninae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	subesferoidal	21–23 × 20–23 (22 × 21)	1.0–1.1 (1.0)	1–3 (geralmente 2 bonded)	rugosidade baixa a moderada	presente
	<i>Tolmomyias sulphurescens</i> Spix (Rhynchocyclidae: Rhynchocyclinae)			18–23 × 18–22 (20 × 20)	1.0–1.1 (1.0)			
<i>Isospora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	Berto et al. (2009b)	elipsoidal	26–31 × 19–23 (28 × 21)	1.2–1.4 (1.3)	geralmente 1-2	suave	ausente
<i>Isospora attilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)	Rodrigues et al. (2015)	subesferoidal a elipsoidal	18–22 × 18–21 (20 × 19)	1.0–1.2 (1.1)	1–2	suave	ausente
<i>Isospora lopesi</i> Silva-Carvalho; Berto, 2018	<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	subesferoidal a ovoidal	18–24 × 18–22 (21 × 20)	1.0–1.2 (1.1)	1	suave	ausente
<i>Isospora oliveirai</i> Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye) (Tityridae: Schiffornithinae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	Subesferoidal	24–28 × 23–27 (26 × 25)	1.0–1.1 (1.0)	1–6	ligeiramente áspero	ausente
<i>Isospora leptopogoni</i> Mel ; Berto	<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	presente estudo	subesferoidal a ovoidal	19–25 × 18–23 (22 × 20)	1.0–1.3 (1.1)	1–3	suave	presente, delicada ou discreto

Tabela 1. Morfologia comparativa de *Isospora* spp., registrada em aves Tyrannida (Continuação).

Espécies	Hospedeiro	Referência	Esporocisto					
			Forma	Tamanho (µm)	L/W ratio	Corpo de Stieda	Corpo de Sub-Stieda	Resíduo do esporocisto
<i>Isospora araponga</i> Doležalová, Torres, Fernández; Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	elipsoidal ligeiramente assimétrica	12–13 × 7–9 (12 × 8)	1.3–1.7 (1.5)	pouco visível	ausente	compacto
<i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	ovoidal	11–13 × 8–10 (12 × 8)	1.0–1.5 (1.4)	achatado, (0.3 × 1.2)	prominente, (1.2 × 2.5)	difuso
	<i>M. ferox</i> (Tyrannidae: Tyranninae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	ovoidal a elipsoidal	14–15 × 9–10 (15 × 10)	1.4–1.6 (1.5)	achatado a meia-lua, 0.5–0.7 × 1.3–2.2 (0.6 × 1.7)	arredondado para trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9)	difuso
	<i>Tolmomyias sulphurescens</i> Spix (Rhynchocyclidae: Rhynchocyclinae)				11–15 × 8–10 (13 × 9)	1.3–1.6 (1.5)		
<i>Isospora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	Berto et al. (2009b)	alongado-elipsoidal	17–22 × 10–13 (20 × 12)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 × 1.1)	prominente, (1.4 × 2.1)	compacto, subesférico
<i>Isospora attilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira; Lopes, 2015	<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)	Rodrigues et al. (2015)	elipsoidal	12–15 × 7–9 (13 × 8)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 × 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 × 4.0)	difuso
<i>Isospora lopesi</i> Silva-Carvalho; Berto, 2018	<i>Platyrrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	elipsoidal	12–16 × 8–11 (15 × 9)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-Formad, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	difuso
<i>Isospora oliveirai</i> Ortúzar-Ferreira; Berto, 2020	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye) (Tityridae: Schiffornithinae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	Formato limão	10–11 × 6–7 (10 × 6)	1.6–1.7 (1.6)	knob-like to half-moon-Formad, (2.0 × 3.5)	rounded, (2.5 × 3.5)	difuso
<i>Isospora leptopogoni</i> Melo; Berto	<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	present study	Formato limão	12–17 × 8–11 (15 × 9)	1.3–1.8 (1.6)	knob-like, (1.1 × 1.8)	retangular to rounded, (1.6 × 2.1)	compacto

Apesar dessas observações filogenéticas, os valores de suporte para a árvore foram muito baixos, inclusive para a colocação de *I. leptopogoni*, tornando qualquer interpretação da topologia com pouco significado. De qualquer forma, esta sequência de *250 pb de *I. leptopogoni*, mesmo que curta e filogeneticamente inconclusiva, representa uma identificação molecular mínima para esta espécie que a separa de outras *Isospora* spp. de Passeriformes até então depositados no GenBank; esta sequência pode ser utilizada no futuro para complementar o sequenciamento de outras regiões gênicas próximas em seu genoma mitocondrial.

Por fim, a comparação de *I. leptopogoni* com *Isospora* spp. registradas a partir de aves Tyrannida (**Tabela 1**), além da identificação molecular por sequenciamento do gene COI, apoia claramente a designação como uma espécie única.

Portanto, *I. leptopogoni* é considerada nova para a ciência, sendo a terceira espécie descrita de Rhynchocyclidae e a sétima registrada na parvordem Tyrannida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTO, B. P., LUZ, H. R., FLAUSINO, W., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 74, 75–80.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., LUZ, H. R., FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. (2009b). *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, 54, 301–304.
- BERTO, B. P., FLAUSINO, W., MCINTOSH, D., TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, 80, 159–204.
- BERTO, B. P., MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 1– 15.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host environment interaction. *Journal of Parasitology*, 106, 707–713. **BirdLife International**. (2022).
- DOLEZALOVÁ, M., TORRES, J., FERNÁNDEZ, H.; MODRÝ, D. (2004). *Isospora araponga* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of *Isospora* Schneider from a bare-throated bellbird, *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Cotingidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99, 829–830.
- DOLNIK, O. (2006). The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, 100, 155–160.
- DOLNIK, O. V., PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. (2009). Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal of Parasitology**, 95, 169–174.
- DOLNIK, O.V., DOLNIK, V.R.; BAIRLEIN, F. (2010). The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. **Ardea** 98, 97–103.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal of Parasitology**, 83, 333–336.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2019). Morphological and molecular identification of *Isospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoninae) in South America. **Acta Protozoologica**, 58, 17–23.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V.,

OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2020). Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira; Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology International*, 75, 102040. *123 Systematic Parasitology* (2022) 99:525–534 533

ICMBIO. (2022). Parque Nacional do Itatiaia. Accessed 26 Jan 2022.

ICZN. (2012). International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bulletin of zoological nomenclature*, 69, 161–169.

IUCN Red List for birds.. Accessed 26 Jan 2022.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.

LOPES, B.D., BERTO, B.P., FERREIRA, I., LUZ, H.R.; LOPES, C.W.G. (2013). Coccidial distribution from passerines in an area of Atlantic Forest in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil. *Coccidia*, 1, 10–16.

MARONEZI, C., OLIVEIRA, M.S., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., MELLO, E.R., CEPEDA, P.B., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M.; BERTO, B.P. (2022) *Isospora* spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny; Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. *Systematic Parasitology*, 99, 285–297.

MELLO, E.R., OLIVEIRA, M.S., ANDRADE, L.A.S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M.; BERTO, B.P. (2022). *Isospora basileuterusi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the pula-pula *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America. *Current Research in Parasitology; Vector-Borne Diseases*, 2, 100079.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., MELLO, E.R., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I.; BERTO, B.P. (2020). *Isospora oliveirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish *schiffornis* *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. *Acta Parasitologica*, 65, 843–851.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., MELLO, E.R., MELO, J.O., OLIVEIRA, M.S., THODE-FILHO, S., CARDOZO, S.V., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2021). Redescription and molecular identification of *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira; Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tiranídeos (Tyrannoidea) in South America. *Systematic Parasitology*, 98, 333–341.

PACHECO, J.F., SILVEIRA, L.F., ALEIXO, A., AGNE, C.E., BENCKE, G.A., BRAVO, G.A., BRITO, G.R.R., COHN-HAFT, M., MAURÍCIO, G.N., NAKA, L.N., OLMOS, F., POSSO, S., LEES, A.C., FIGUEIREDO, L.F.A., CARRANO, E., GUEDES, R.C., CESARI, E., FRANZ, I., SCHUNCK, F.; PIACENTINI, V.Q. (2021). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. *Ornithology Research*, 29, 94–105.

RIDGELY, R.S., GWYNNE, J.A., TUDOR, G.; ARGEL, M. (2015). Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste. São Paulo: Horizonte, 417 pp. Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. do B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I.; Lopes, C. W. G. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. **Zootaxa**, 4034, 193–196.

RODRIGUES, M.B., OLIVEIRA, J.L.G., SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G.N., GOMES, J.V., OLIVEIRA, M.S., SIQUEIRA, P.B., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2019). The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro; Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 96, 423-431.

SICK, H. (1997). Ornitologia brasileira. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 pp.

SILVA-CARVALHO, L. M., PASTURA, D. G. N., GOMES, J. V., SIQUEIRA, P. B., RODRIGUES, M. B., LIMA, V. M.; BERTO, B. P. (2018a). *Isospora lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, 95, 455–463.

SILVA-CARVALHO, L.M., PASTURA, D.G., RODRIGUES, M.B., GOMES, J.V., OLIVEIRA, M.S., SIQUEIRA, P.B., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., SOARES, S.S., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2018b). *Isospora sagittulae* McQuiston; Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the neotropical region. **Parasitology Research**, 117, 2635–2641.

SILVA-CARVALHO, L.M., GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L., OLIVEIRA, M.S., RODRIGUES, M.B., ABREU, S.T., ORTUZAR-FERREIRA, C.N., FRANCO, H.A., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A. A., LIMA, V.M., FERREIRA, I., BERTO, B.P. (2019). *Isospora borbai* (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnateaters *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America. **Acta Parasitologica**, 64, 617–624.

WILLIAMS, R. B., THEBO, P., MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J.A. (2010). Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76, 69–76.

YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A.; RYAN, U. (2015). *Isospora serinuse* (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma doméstica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, 159, 59–66.

CAPÍTULO IV

ABORDAGENS MOLECULARRES E ESTATÍSTICAS PARA A DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE EIMERIIDAE: UM CASO DE EXTREMO POLIMORFISMO EM OOCISTOS EIMERIANOS DE POMBAS-AMARGOSAS *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (COLUMBIFORMES) NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar, morfológica, estatística e molecularmente, oocistos eliminados de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 de uma localidade a 2197 metros de altitude próxima ao pico das Agulhas Negras, ponto mais alto do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Os oocistos se apresentaram extremamente polimórficos, com formato subesferoidal, ovóides ou elipsoides, além de apresentarem a presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. A regressão linear confirmou o polimorfismo extremo dos oocistos, mostrando que se todas as combinações de caracteres taxonômicos em oocistos (morfotipos) fossem superestimadas, 19 espécies diferentes poderiam ser identificadas/descritas. Por outro lado, a análise de comparação de médias entre oocistos com presença/ausência de características e os histogramas mostrou equivalências e regularidade na distribuição nas classes de medidas, que indicam a presença de uma única espécie nos oocistos medidos. As análises moleculares foram realizadas a partir do isolamento de oocistos individuais de diferentes morfotipos, os quais tiveram seu material genético extraído, amplificado e sequenciado em 4 *loci não sobrepostos* nos genes *cox1*, *cox3* e fragmentos de pequena e grande subunidade rDNA do DNA mitocondrial. As sequências foram 100% idênticas entre os morfotipos, com exceção de uma divergência muito pequena observada no *locus* que cobre parcialmente o gene *cox3*. A análise filogenética foi inconclusiva para o *locus* dentro do gene *cox1* tradicionalmente usado para coccídios eimerídeos, porém os outros *loci* devem ter um futuro promissor para estudos filogenéticos quando mais sequências para as mesmas regiões gênicas forem depositadas no GenBank. Finalmente, a análise multifatorial do presente trabalho sustentou que os oocistos polimórficos eliminados de *P. plumbea* são uma única espécie, que foi nomeada como *Eimeria patagioenasae*, tornando esta a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

Palavras-chave: *Eimeria patagioenasae*; coccídios; Oocistos; morfologia; Morfometria; Sequenciamento; filogenia; Aves neotropicais; Parque Nacional de Itatiaia; Brasil.

ABSTRACT

The current work aimed to analyze, morphologically, statistically and molecularly, oocysts shed from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) from a locality at 2.197m of altitude near the Agulhas Negras peak, the highest point of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The oocysts were extremely polymorphic, being subspheroidal, ovoidal or elipsoidal, in addition to having the random presence/absence of characteristic features associated with the oocyst wall, such as micropyle, micropyle cap, lateral micropyle and outer veil/rough wall. Linear regression confirmed the extreme polymorphism of oocysts, showing that if all combinations of taxonomic characters in oocysts (morphotypes) were overestimated, 19 different species could be identified/described. In contrast, the means comparison analysis between oocysts with presence/absence of characteristic features and the histograms showed equivalences and regularity in the distribution in the classes of measures, which indicate the presence of a single species in the measured oocysts. Molecular analyzes was performed from the isolation of individual oocysts of different morphotypes, which had their genetic material extracted, amplified and sequenced in 4 non-overlapping *loci* in *cox1*, *cox3* genes and fragments of small and large subunit rDNA of mitochondrial DNA. The sequences were 100% identical between the morphotypes, with the exception of a very small divergence observed at the *locus* that partially covers the *cox3* gene. The phylogenetic analysis was inconclusive for the *locus* within *cox1* gene traditionally used for eimeriid coccidians, however the other *loci* should have a promising future for phylogenetic studies when more sequences for the same genic regions are deposited in GenBank. Finally, the multifactorial analysis of the current work supported that the polymorphic oocysts shed from *P. plumbea* are a single species, which was named as *Eimeria patagioenasae*, making this the twenty-second eimerian description from Columbiformes.

Keywords: *Eimeria patagioenasae*; coccidia; oocysts; morphology; morphometry; sequencing; phylogeny; Neotropical birds; Parque Nacional de Itatiaia; Brazil.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da diversidade parasitária de animais silvestres é escasso quando comparado ao que se sabe sobre a diversidade de parasitas de animais domésticos e humanos. Em um estudo recente, Duszynski (2021) apontou que da diversidade atual de vertebrados, apenas uma parcela muito pequena foi examinada para coccídios. No mesmo sentido, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) demonstraram na época que das 367 espécies de aves Columbiformes no mundo, apenas 15 foram relatadas como hospedeiras coccídios.

Pombos e pombas (Columbiformes) são hospedeiros de uma ampla gama de parasitas, desde ectoparasitas como hipoboscídeos, malófagos, piolhos e ácaros até endoparasitas como helmintos, hemoprotozoários e coccídios (Atkinson et al. 2008; Taylor et al. 2017). Nesse sentido, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) realizaram uma revisão taxonômica de coccídios eimerídeos de Columbiformes, onde foram registradas 19 *Eimeria* spp e 2 *Isospora* spp. Desde então, duas novas descrições de *Eimeria* spp foram adicionadas: *Eimeria chalcopterae* Yang, Brice, Berto; Ryan, 2020 e *Eimeria ferreirai* Oliveira; Berto, 2020 (Oliveira et al. 2020; Yang et al. 2020). Portanto, atualmente um total de 21 *Eimeria* spp são registrados para aves columbiformes.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo examinar amostras fecais de aves silvestres em uma localidade a 2.197 metros de altitude, próxima ao pico das Agulhas Negras, ponto mais alto do Estado do Rio de Janeiro. Oocistos com diferentes formas e características irregulares foram observados em pombas-amargosas *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), que é uma espécie columbiforme com média dependência florestal e relacionada a ambientes bem preservados na América do Sul; e no sudeste do Brasil, observados principalmente nas encostas de regiões montanhosas (Sick 1997; Mello et al., 2020; BirdLife Internacional 2023). Neste sentido, um estudo morfológico detalhado destes oocistos polimórficos é fornecido aqui, associado a estudos estatísticos e moleculares, visando a identificação específica destes oocistos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas de amostras

Uma única expedição foi realizada no planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO 2023). Essa expedição ocorreu em novembro de 2021, especificamente no Km 13 da Travessia Ruy Braga (22°24'29.97"S; 44°39'04.07"W), que é a trilha que leva ao planalto de altitude onde está localizado o pico das Agulhas Negras. Redes de neblina foram utilizadas para a captura das aves.

Três pombas-amargosas *P. plumbea* foram capturados. As aves capturadas foram especificamente identificadas (Ridgely et al. 2015; Mello et al. 2020), fotografado e atado com anéis de metal numerados fornecidos pela Agência Brasileira de Anilhagem de Aves (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE). Posteriormente, as aves foram mantidas em caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, quando foram soltas no mesmo local de captura. Cada gota fresca de fezes de cada ave foi colocada individualmente em um tubo de centrifuga com uma solução de dicromato de potássio 2.5% (K₂Cr₂O₇) (Dolnik 2006).

2.2 Análise Morfológica

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 7 dias. Os oocistos foram isolados por flutuação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1.20) e examinados microscopicamente pela técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014). Observações morfológicas, desenhos de linhas, fotomicrografias e medidas foram realizadas utilizando-se um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Desenhos de linhas, fotomicrografias e outras figuras foram editados usando dois softwares (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) da CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 2020, Corel Corporation, Canadá). Todas as medições foram realizadas em micrômetros e são apresentadas seguido da média entre parênteses.

2.3 Análise Estatística

Três métodos estatísticos foram empregados após avaliação prévia dos dados pelo teste de normalidade de D'Agostino's: (1) Análise de variância (ANOVA); utilizada para comparar medidas do diâmetro maior, diâmetro menor e índice morfométrico dos oocistos e esporocistos com diferentes características, utilizando o pacote estatístico Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007) para calcular a média, variância, grau de liberdade e valor de *p* (Sampaio 2002; Berto et al. 2014); (2) Foram elaborados histogramas para plotar os valores de diâmetro maior, diâmetro menor e índice morfométrico dos oocistos, bem como suas frequências relativas, de acordo com os métodos de Sampaio (2002) e Berto et al. (2014); (3) Regressão linear para determinar a distribuição dos oocistos utilizando métodos propostos por Norton e Joyner (1981) e posteriormente modificados por Berto et al. (2014). Os gráficos, a regressão de linhas, os pontos de dados, o valor de R² (coeficiente de determinação) e o coeficiente de reta de regressão foram obtidos utilizando-se o software Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, Washington).

2.4 Análise Molecular

Oocistos individuais, foram analisados morfolologicamente em detalhes e fotomicrografados em microscopia óptica, após isolados, ressuspensos em 90 µl PBS (ou seja, cada oocisto com morfologia analisada estava contido em cada suspensão de PBS), de acordo com as diretrizes de Dolnik et al. (2009).

Quatro ciclos de congelamento-descongelamento (- 4 °C e 96 °C, respectivamente) de 5 minutos cada foram aplicados para quebrar a parede do oocisto antes da extração do DNA para obter a lise completa do oocisto. Após esta etapa, foram adicionados 10 µl de proteinase K, deixando-a incubar em banho-maria a 56 °C por aproximadamente 2 h. A extração completa do DNA foi realizada utilizando o kit Qiagen DNeasy™ Blood and Tissue (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR de quatro loci diferentes (não sobrepostos) do genoma mitocondrial foi direcionada (**Figura 1**). Três desses loci foram projetados usando Primer-BLAST ([//www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)), e o quarto foi o locus COIBF1, desenvolvido principalmente por Dolnik et al. (2009) e amplamente aplicado a coccidianos eimeriídeos desde então (**Tabela 1**). Para amplificação, uma reação de PCR de 25 µl foi preparada usando 3 µl de DNA genômico (<1 µg), 12,5 µl de GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0,25 µl de cada Primer (0,2 µM) e 9 µl de água sem nuclease. As amplificações por PCR foram conduzidas usando as condições de ciclagem mostradas na **Tabela 1**. Os amplicons dos nested PCRs foram purificados usando o Qiagen

MinElute™ PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

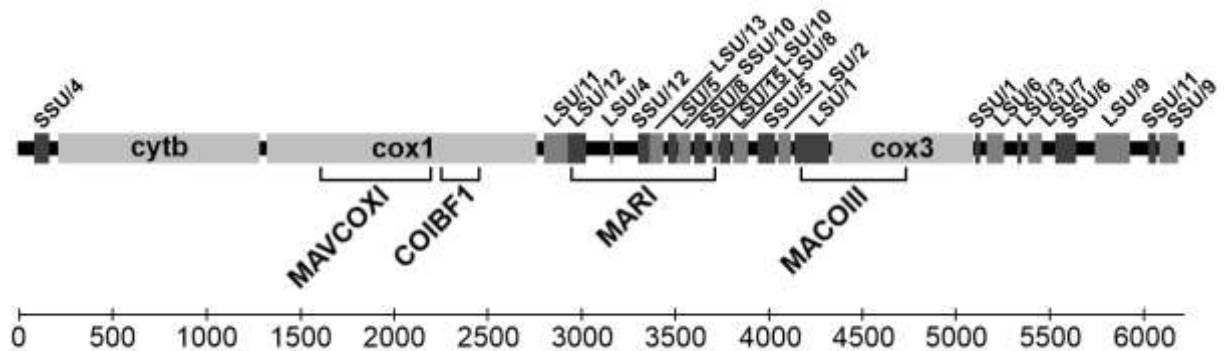


Figura 1. Organização do genoma mitocondrial de *Eimeria* spp. de aves (baseado no genoma mitocondrial completo de *Eimeria dispersa* disponível no GenBank/BLAST sob o número de acesso KJ608416): Os *loci* MAVCOXI (posicionados entre ~1.600–2.200 nt) e COIBF1 (posicionados entre ~2.250–2.500 nt) ocupam o gene *cox1*; o *locus* MARI (posicionado entre ~2.950–3.750 nt) ocupa fragmentos de rDNA de subunidade pequena (SSU) e subunidade grande (LSU); e o *locus* MACOI (posicionado entre ~4.200–4.750 nt) ocupa o fragmento LSU/1 rDNA e o gene *cox3*.

2.5 Análises de sequência de DNA

Todos os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os iniciadores (*primers*) PCR forward e reverse da Ludwig Biotechnology, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi utilizado para o sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados no Programa Chromas 2.6. As sequências foram comparadas com outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados GenBank usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Os alinhamentos foram criados no MEGA versão 10.2.6 usando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). As relações filogenéticas foram reconstruídas usando a Inferência Bayesiana no Mr. Bayes versão 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) e o método de máxima verossimilhança no MEGA (Kumar et al. 2018).

Os modelos evolutivos mais adequados para todas as análises filogenéticas foram selecionados pela Seleção de Modelos no MEGA. A análise de Inferência Bayesiana foi conduzida sob o modelo evolutivo GTR +G para 1.000.000 de gerações, e as árvores foram resumidas após a remoção de 25% do burn-in. A análise de máxima verossimilhança foi realizada sob o modelo evolutivo TN93 +G, e os valores de *bootstrap* foram calculados por 1.000 réplicas. As árvores filogenéticas resultantes foram visualizadas em MrBayes e MEGA e exportadas em FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem para amplificação por PCR de quatro *loci* do genoma mitocondrial.

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	Sequência <i>primers</i>	Condições de ciclismo
COIBF1	COIBf1 (externo; <i>forward</i>)	5' GWTCATTAGTATGGGCACATCA 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	COIBr1 (externo; <i>reverse</i>)	5' CCAAGAGATAATACRAARTGGAA 3'	
	COIBf2 (interno; <i>forward</i>)	5' GGGCACATCATATGATGAC 3'	
	COIBr2 (interno; <i>reverse</i>)	5' ATAGTATGTATCATGTARWGCAA 3'	
MACOIII	MACOIII <i>f</i> (<i>forward</i>)	5' CTGTAGAGTCGAGATGGAAACAA 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 42 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	MACOIII <i>r</i> (<i>reverse</i>)	5' CCTAGAATAAACTGGCTGTAGAT AG 3'	
MAVCOXI	MAVCOXI <i>f</i> (<i>forward</i>)	5' GCCAGGTCTATATGGTGGATATG 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por 54 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min
	MAVCOXI <i>r</i> (<i>reverse</i>)	5' TGCCCAGACTAATGAACCTAAC 3'	
MARI	MARI <i>f</i> (<i>forward</i>)	5' GCTCATCACACCCTGTACTT 3'	35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por 54 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 min.
	MARI <i>r</i> (<i>reverse</i>)	5' CCCGGCTAAACTTCCCTTATT 3'	

3 RESULTADOS

3.1 Prevalência e Descrição

Três pombas-amargosas (*P. plúmbea*) foram examinadas e 02 (duas) testaram positivo para oocistos de coccídios. Esses oocistos se apresentaram polimórficos em tamanho, forma e na presença/ausência de certas características. No entanto, em qualquer caso, todos os morfotipos foram distintos das espécies de coccídios registradas como parasitos de Columbiformes (**Tabela 2**). Este material é descrito abaixo:

Eimeria patagioenasae Ortúzar-Ferreira; Berto (**Figuras 2, 3**)

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Oocistos (n = 40) subesferoidais (18%), ovovais (45%) ou elipsoidais (37%), 21–31 × 16–23 (26,1 × 20,1); Índice morfométrico de 1,0–1,6 (1,31). Bicamadas de parede, 1,5–2,0 (1,8 µm) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 de espessura total. Alguns oocistos (38%) apresentaram uma membrana enrugada (provavelmente o véu externo) aderida à camada

externa da parede do oocisto, levando a uma aparência áspera da parede do oocisto. Micrópila presente na extremidade longitudinal da maioria dos oocistos (78%), 2,0–9,2 (4,7) de largura; aleatoriamente associada a um capuz polar (48%), 0,8–2,7 de altura \times 4,0–10,5 de largura (1,6 \times 7,1).

Uma micrópila lateral foi observada em alguns oocistos (35%), com 3,9–8,9 (6,6) de largura. Resíduo de oocisto ausente, mas 1–2 grânulos polares (geralmente 1) presentes, 2,3–3,1 \times 1,3–2,4 (2,7 \times 1,8).

Esporocisto (n = 27) elipsoidal alongado a fusiforme, 13–18 \times 6–8 (15,0 \times 7,4); Índice morfométrico de 1,8–2,3 (2,04).

Corpo de Stieda presente, achatado a semelhante a um botão, pouco discernível do corpo sub-Stieda em alguns esporocistos, 0,4–0,9 de altura \times 0,9–1,5 de largura (0,6 \times 1,2). Corpo sub-Stieda present, arredondado a trapezoidal, 0,8–1,4 de altura \times 1,3–2,2 de largura (1,0 \times 1,8).

Corpo de Para-Stieda ausente.

Resíduo de esporocisto presente, constituído por numerosos grânulos espalhados entre os esporozoítos.

Esporozoítos vermiformes, com corpos refratários posterior e anterior, 3,4–5,9 \times 2,4–3,3 (4,4 \times 2,8), e núcleo central.

3.1.1 Diagnóstico

Eimeria patagienasae é a única espécie de coccídio registrada na espécie hospedeira *P. plumbea*. Os oocistos de *E. patagienasae* são identificáveis pela presença aleatória de micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa, que podem ser subesferoidais, ovóides ou elipsoides, além das características típicas dos esporocistos fusiformes com corpos de Stieda e sub-Stieda (Figs. 2 e 3). Com base nesses e em outros caracteres taxonômicos, as diferenças entre *E. patagienasae* e outras *Eimeria* spp., registradas em Columbiformes, estão resumidas na **Tabela 2**. Das 21 espécies de coccídios registradas para Columbiformes até o momento, apenas *Eimeria turturi* Golemsky, 1976 tem forma (índice morfométrico de 1,3) e tamanho compatíveis com *E. patagienasae*, no entanto, esta espécie é facilmente diferenciada pela ausência de micrópila e grânulo polar, além da forma, tamanho e outras características dos esporocistos.

Eimeria kapotei Chatterjee ; Ray, 1969, *Eimeria waiganiensis* Varghese, 1978, *Eimeria duculai* Varghese, 1980, *Eimeria palumbi* McQuiston, 1991, *Eimeria zenaidae* Adriano et al. 2003, *Eimeria janovyi* Bandyopadhyay et al. 2006, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška; Modrý, 2012, *Eimeria lyoni* Yabsley et al. 2015 e *E. chalcopterae* são ligeiramente semelhantes em tamanho (mas não forma) a *E. patagienasae*, além de serem facilmente diferenciadas pela ausência de micrópila e/ou outras características dos esporocistos.

Eimeria ferreirai é ligeiramente semelhante a *E. patagienasae*, que são simpátricas (hospedeiras e coccídios) no Parque Nacional do Itatiaia; *E. patagienasae* pode ser diferenciado, além do tamanho e forma, por micrópilas aleatoriamente presentes, forma de esporocisto e corpos de Stieda e sub-Stieda ligeiramente distintos, enquanto *E. ferreirai* tem apenas um corpo de Stieda bem definido como estrutura de excistamento.

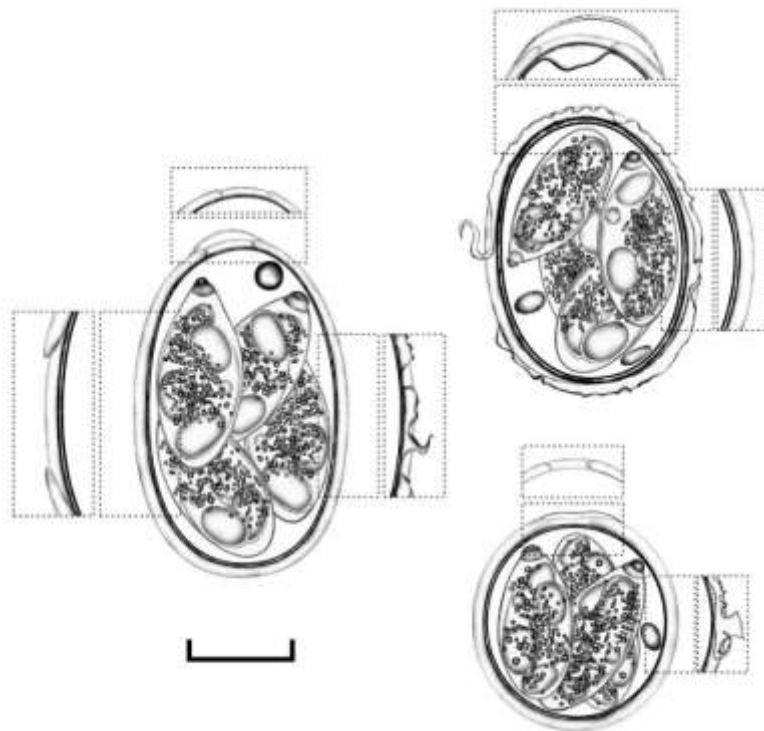


Figura 2. Desenhos de linhas de oocistos elipsoidais, ovoide (forma ovalada) e subesferoidais de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargas *Patagioenas plumbea*, com presença/ausência aleatória de características associadas à parede do oocisto, como micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa. Barra de escala: 10 μ m.

3.1.2 Resumo Taxonômico

Hospedeiro-tipo: *Patagioenas plumbea* Vieillot, 1818 (Aves: Columbiformes: Columbidae), pomba-amargosa.

Localidade-tipo: Planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia (22°24'29.97"S; 44°39'04.07"W), Sudeste do Brasil. Material-tipo: Fotossíntipos, desenho de linhas e oocistos em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (Williams et al. 2010) estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob o número de repositório P-132/2023.

Fotografias do espécime tipo-hospedeiro (simbiótipo) são depositadas na mesma coleção.

Sequência representativa de DNA: A amplificação do DNA dos *loci* COIBF1, MACOIII, MAVCOXI e MARI mostrou bandas claras em torno de ~250 pb, ~ 632 pb, ~ 653 pb e ~824 pb, respectivamente (**Figura 4**).

Sequências representativas foram depositadas no banco de dados do GenBank sob os números de acesso: OQ790143 (COIBF1, oocisto ovoide com capuz polar e micrópila); OQ790144 (COIBF1, oocisto subesferoidal com micrópila); OQ790137 (COIBF1, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790145 (MACOIII, oocisto subesferoidal com micrópila); OQ790140 (MACOIII, oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral); OQ790139 (MACOIII, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790138 (MAVCOXI, oocisto elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral); OQ790142 (MAVCOXI, oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral); OQ790141 (MARI, oocisto elipsoidal com véu externo/parede

rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral).

Registro no ZooBank: Para cumprir os regulamentos estabelecidos no Artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 2012), detalhes da nova espécie foram apresentados ao ZooBank.

O Life Science Identifier (LSID) do artigo é urn:lsid:zoobank.org/pub.

O LSID para o novo nome *Eimeria patagioenasae* Ortúzar-Ferreira; Berto é urn:lsid:zoobank.org/act.

Local de infecção: Desconhecido, oocistos foram recuperados das fezes.

Prevalência: 67% (2 de 3 aves examinadas).

Etimologia: O nome específico é derivado do nome genérico do hospedeiro-tipo.



Figura 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargas *Patagioenas plumbea*: oocistos elipsoidais (A–H), ovais (I–N) e subesferoidais (O–R). Observe a camada interna (il), camada externa lisa (sol) e/ou véu externo/camada externa áspera (ov/rol) na parede do oocisto, micrópila lateral (lm), micrópila (m), capa de micrópila (mc), núcleo (n), grânulo polar (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpos Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala: 10 µm.

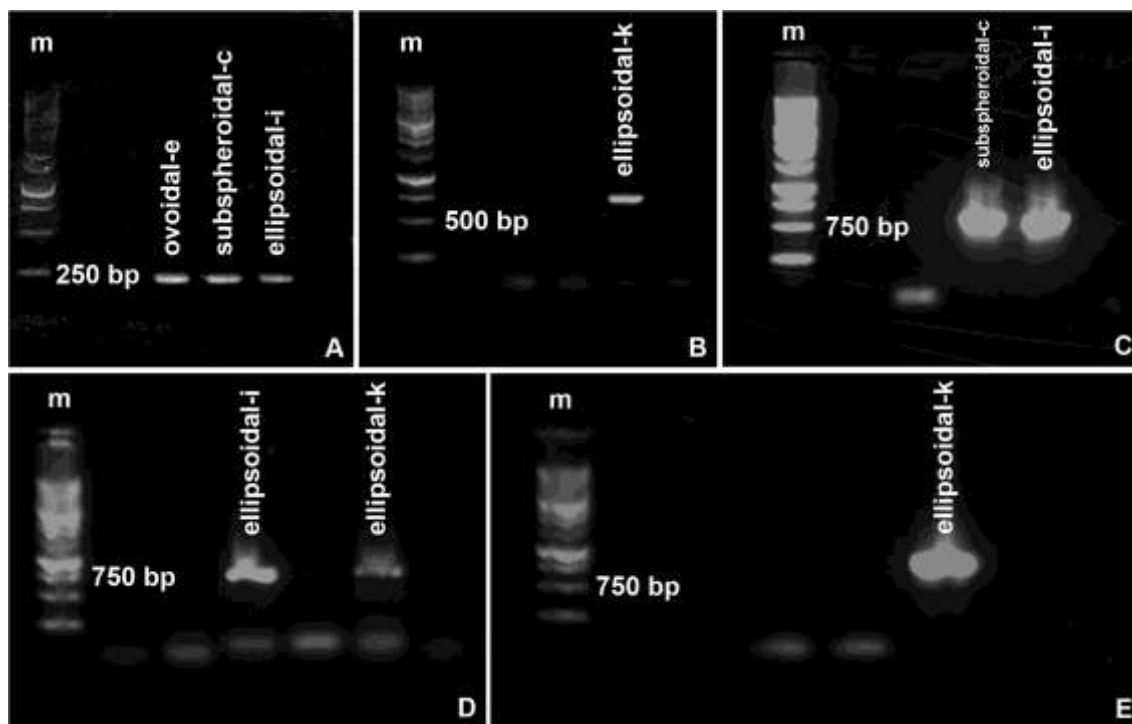


Figura 4. Perfil eletroforético de PCR para os locos COIBF1 (A), MACOIII (B, C), MAVCOXI (D) e MARI (E) do genoma mitocondrial de *Eimeria patagioenasae* de pombas amargosas *Patagioenas plumbea*, obtido em gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular (m) Escada de DNA Promega 1 kb (250–10.000 pb). Os morfotipos “subesferoidal-c”, “ovoidal-e”, “elipsoidal-i” e “elipsoidal-k” referem-se à extração de DNA de oocistos individuais subesferoidais com micrópila; ovoidal com capa de micrópila e micrópila; elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.

Tabela 2. Morfologia comparada de *Eimeria* spp., registrada em Columbiformes do Mundo.

Coccidia	Hospedeiro	Localidade	Referências	Oocysts					Esporocistos									
				Forma	Length (μm)	Width (μm)	L/W ratio	Parede	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar	Forma	Length (μm)	Width (μm)	L/W ratio	Corpo de Stieda	Corpo de Substieda	Resíduo
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Ásia, Índia	Pinto (1928)	subesferoidal a ovoidal	17–21 (16.7)	16–18 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	suave	ausente	presente	presente	ovoidal	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	presente
			Nieschulz (1935)	Subesferoidal a elipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	suave	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
	<i>Streptopelia decaocto</i> Frivaldszky, 1838 <i>Columba palumbus</i> Linnaeus, 1758	Europa, Portugal	Oliveira et al. (2021)	subesferoidal a elipsoidal	16–21 (18.5)	14–17 (15.5)	1.0–1.4 (1.19)	suave	ausente	presente, 1–3	presente, 1–3	ovoidal ou ligeiramente reniforme	11–14 (12.2)	5–7 (5.9)	1.9–2.3 (2.08)	presente, triangular	ausente	presente
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Ásia, Índia	Nieschulz (1935)	Subesferoidal a ovoidal	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	suave	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
<i>Eimeria columbae</i> Mitra ; Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Ásia, Índia	Mitra and Das Gupta (1937)	Subesferoidal a ovoidal	(16.4)	(14.4)	–	–	presente	ausente	–	elipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	presente
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Ásia, Índia	Ray (1952)	riniforme a elipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	suave com um amassado lateral	ausente	presente, assimétrico, com tampa da micrópila	–	amplamente ovoidal	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	presente
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee ; Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Ásia, Índia	Chatterjee and Ray (1969)	sub-spherical	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	presente, anterior	presente, 1–2	ovoidal	8–10	–	–	presente	–	presente, disperso
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Bulgária	Golemansky (1976)	elipsoidal ou amplamente ovoidal	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	suave, ~1.5	ausente	ausente	ausente	elipsoidal alongado	11–13 (10.0)	6–8 (7.0)	–	ausente	–	presente, disperso
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	<i>Chalcophaps indica</i> (Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	amplamente ovoidal	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	suave, ~1.5	ausente	presente, 4–6 (5)	presente, 2–4	ovoidal	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	presente, proeminente	presente, pequeno	presente, disperso
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	<i>Ducula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	amplamente ovoidal	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	suave, 1.5–2.5 (2.0)	ausente	discreto	presente, 1, ~2.0	alongado	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	presente, proeminente, cônico	ausente	presente, compactado, membrana-delimitado

<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	sub-spherical	19–22 (20)	18–21 (20)	1.0– (1.0)	suave, ~1.0	ausente	ausente	presente, 1, ~2.0	alongado	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	present	ausente	presente, compacto
<i>Eimeria palumbi</i> McQuistion, 1991	<i>Zenaida galapagoensis</i> Gould, 1841	South America Ecuador, Galápagos Islands	McQuistion (1991)	ovoidal a elipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0– 1.2 (1.16)	suave, ~2.0	presente, grânulos redondos a lascados	ausente	ausente	elipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	2.1 (1.9)	presente, semelhante a um mamilo	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen ; Cordeiro, 2000	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); <i>Columbina squammata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano et al. (2000)	ovoidal a elipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1– 1.3 (1.2)	suave, ~1.3	ausente	ausente	presente	alongado	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0– 2.2 (2.1)	presente, protuberante, semelhante a um mamilo	ausente	presente, compacto
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen ; Cordeiro, 2003	<i>Zenaida auriculata</i> (Des Murs, 1847)	South America, Brazil	Adriano et al. (2003)	subesférico	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	1.2 (1.2)	rough, ~1.7	ausente	ausente	presente, 1	alongado	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7– 1.9 (1.8)	presente grande	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria janovyi</i> Bandyopadhyay, Bhakta ; Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Ásia, India	Bandyopadhyay et al. (2006)	elipsoidal	(24.3)	(19.8)	1.2	suave, ~1.1	ausente	ausente	present, 1, sub-spherical	pyriform	(12.1)	(10.1)	(1.2)	presente, grande, proeminente	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al- Shawa ; Al- Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Ásia, Saudi Arabia	Alyousif et al. (2009)	alongado elipsoidal	19–23 (21)	14–17 (15)	1.2 (1.2)	suave, 1–1.3 (1.2)	presente, irregular	glóbulo	ausente	elipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	present, pequeno, semelhante a um mamilo	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška ; Modrý, 2012	<i>Columba bipalumbus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Czech and Slovak Republics	Jamriška and Modrý (2012)	elipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0– 1.4 (1.26)	suave, 0.6–1.5 (0.9)	ausente	ausente	presente, 2 irregular, ~2.0	ovoide alongado, ligeiramente assimétrico	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7– 2.2 (1.9)	presente	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones ; Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Africa, Madagascar	Ball et al. (2012)	subesférico	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0– 1.2 (1.1)	suave, ~0.8	ausente	ausente	ausente	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	presente	presente	presente
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey ; Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley et al. (2015)	subesférico a ovoidal	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1– 1.3 (1.2)	suave, ~1.0	ausente	ausente	presente, 1–2	ovoidal	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5– 1.9 (1.7)	presente, tipo botão	presente, arredondado	presente, disperso, granulos of ~1.0
<i>Eimeria</i> sp. of Yang <i>et al.</i> (2016)	<i>C. livia</i>	Oceania, Australia	Yang et al. (2016)	subesférico	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	1.38 (1.38)	suave, ~1.0	presente	ausente	presente	alongado ovoidal	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0– 2.2 (2.1)	presente	ausente	presente, compacto
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira ; Berto, 2019	<i>C. talpacoti</i>	América do Sul, Brazil	Ortúzar- Ferreira et al. (2020)	subesférico a elipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0– 1.2 (1.11)	suave, 1.0–1.2 (1.1)	presentes, granulos ligados e/ou difusos	inconspicuous	ausente	elipsoidal a ligeiramente assimétrica	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6– 2.0 (1.77)	presente, achatado a meia-lua- formada	presente, arredondado	presente, disperso

<i>Eimeria chalcopterae</i> Yang, Brice, Berto; Ryan, 2020	<i>Phaps chalcoptera</i> (Latham, 1790)	Oceania, Australia	Yang et al. (2020)	subesférico,	22–25 (23.5)	21–24 (22.6)	1.0–1.1 (1.04)	suave, 1.0–1.4 (1.2)	ausente	quase impercetível	presente, 2–3	elipsoidal	13–14 (13.5)	7–8 (7.2)	1.8–2.0 (1.88)	presente, achatado a meia-lua	presente, arredondado para trapezoidal	Grânulos presentes, limitados por membrana
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira; Berto, 2020	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855; <i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard ; Bernard, 1792)	América do Sul, Brazil	Oliveira et al. (2020)	Subesférico a elipsoidal	19–25 (21.4)	16–21 (18.8)	1.0–1.4 (1.15)	suave, 1.3–1.9 (1.6)	ausente	presente, com tampa de micrópila quase impercetível	presente, 1–2	alongado ovoide a bumerangue	12–15 (13.4)	6–8 (6.9)	1.8–2.2 (1.95)	presente, triangular to lozangular	ausente	presente, disperso
<i>Eimeria patagioenasae</i> Ortúzar-Ferreira ; Berto n.sp.	<i>Patagioenas plumbea</i> Vieillot, 1818	América do Sul, Brazil	Presente estudo	subesferoidal, ovoidal a elipsoidal	21–31 (26.1)	16–23 (20.1)	1.0–1.6 (1.31)	suave, 1.5–2.0 (1.8), sometimes with outer veil adhered	ausente	presente aleatoriamente na extremidade longitudinal ou lateral, possivelmente com tampa de micrópila	presente, 1–2	elongate elipsoidal a fusiforme	13–18 (15.0)	6–8 (7.4)	1.8–2.3 (2.04)	presente, achatado em forma de botão	presente, arredondado para trapezoidal	presente, disperso

3.2 Análise morfométrica e estatística

A análise de comparação de médias por ANOVA foi realizada de acordo com as características da parede do oocisto, presentes ou ausentes aleatoriamente. Conforme a **Tabela 3**, as médias foram equivalentes ($P > 0,01$), em todas as dimensões morfométricas, entre oocistos com e sem véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.

Os histogramas de diâmetros maior e menor e índice morfométrico dos oocistos (**Figura 5**) e esporocistos (**Figura 6**) foram regulares à medida que as frequências aumentavam e diminuam nas classes de medidas. Esses resultados indicam uma única espécie/população nos oocistos e esporocistos medidos, de acordo com as diretrizes de Sampaio (2002) e Berto et al. (2014).

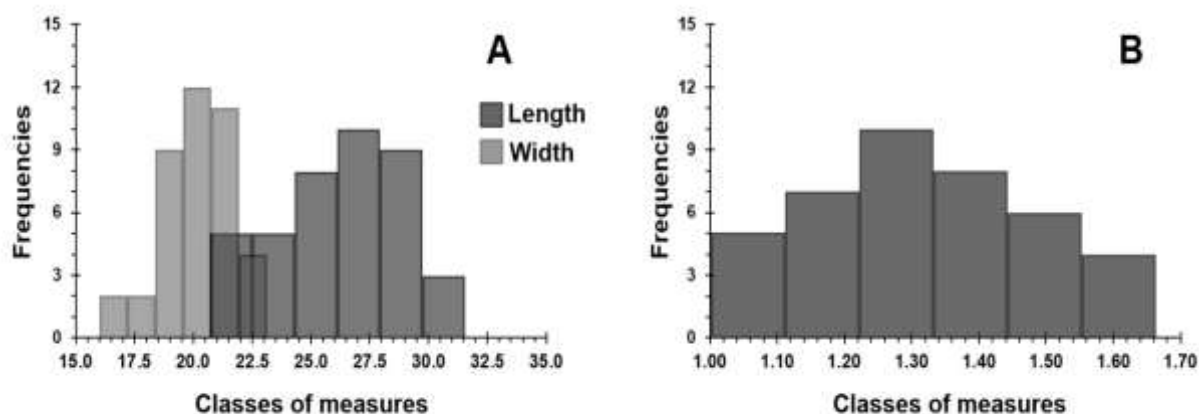


Figura 5. Histogramas de diâmetros maior e menor (A) e índice morfométrico (B) de oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*.

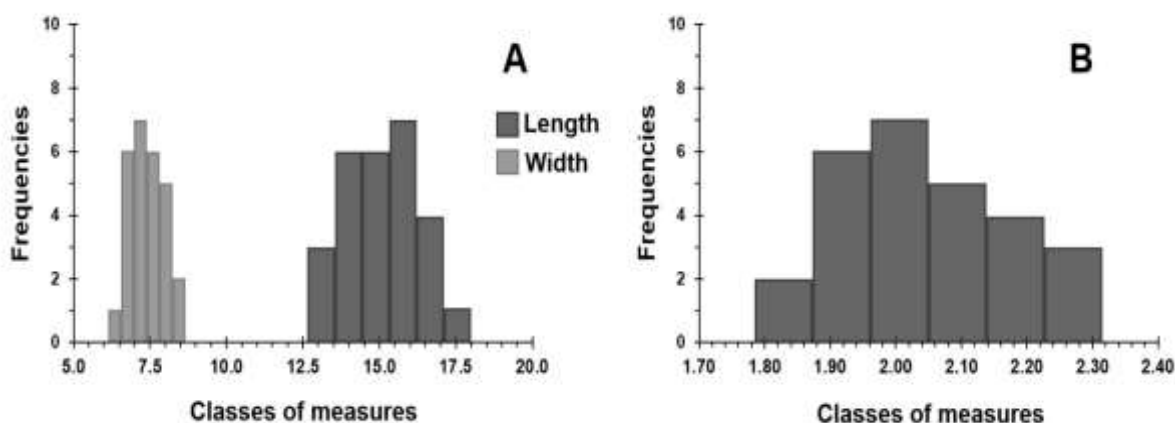


Figura 6. Histogramas de diâmetros maior e menor (A) e índice morfométrico (B) de esporocistos em oocistos de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargosas *Patagioenas plumbea*.

A regressão linear foi realizada para todos os oocistos (**Figura 7**) e esporocistos (**Figura 8**), mas cada formato de oocisto relacionados a combinações de características (morfortipo) foi individualizada e identificada nos gráficos. Como observado, não houve combinação de características correlacionadas com o tamanho/forma do oocisto nas regressões lineares do oocisto e do esporocisto, uma vez que as mesmas combinações de características coincidiram em oocistos subesferoidais, ovóides e elipsóides, de diferentes tamanhos.

O valor muito baixo de R² e os pontos/oocistos distantes da linha de regressão indicaram a natureza extremamente polimórfica dos oocistos. Em contraste, a regressão linear dos esporocistos resultou em um valor de R² de 0,5, que é limítrofe para determinar uma distribuição uniforme (Berto et al., 2014), também confirmada pela proximidade dos pontos de dados/esporocistos à linha de regressão.

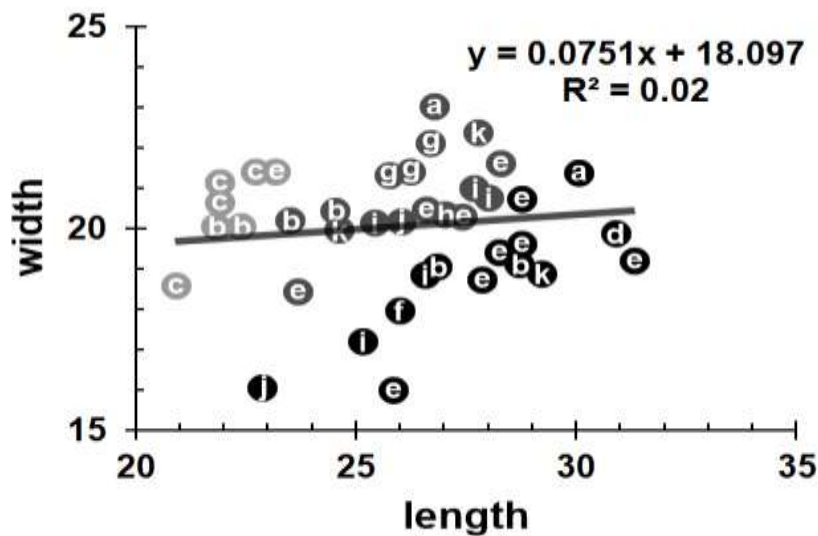


Figura 7. Distribuição dos oocistos subesferóides (cinza-claro), ovóides (cinza escuro) e elipsóides (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 40). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfortipos): (a) parede do oocisto lisa e sem estruturas morfológicas associadas; b) com véu exterior/parede áspera; c) com micrópila; d) com micrópila lateral; e) com capuz polar e micrópila; f) com véu exterior/parede áspera e micrópila; g) com micrópila e micrópila lateral; h) com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.

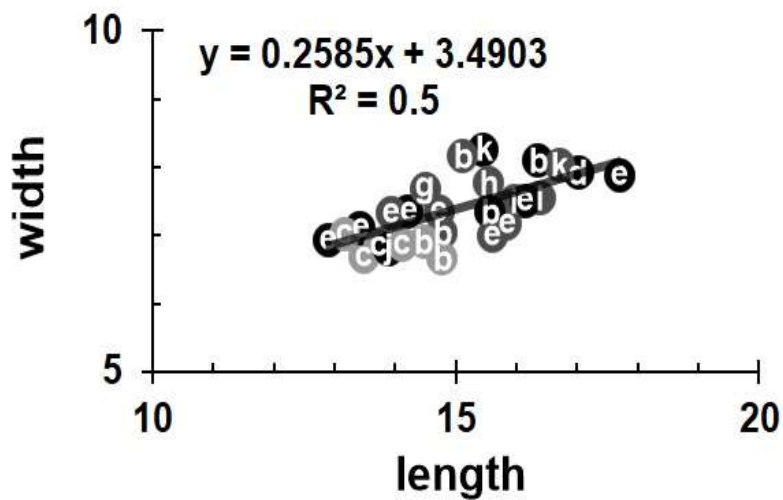


Figura 8. Distribuição dos esporocistos em oocistos subesferoidais (cinza-claro), ovoides (cinza escuro) e elipsoidais (preto) de *Eimeria patagioenasae* em regressão linear (n= 27). As letras indicam as seguintes combinações de características (morfortipos): (b) com véu externo/parede rugosa; c) Com micrópila; d) Com micrópila lateral; e) Com capuz polar e micrópila; g) Com micrópila e micrópila lateral; h) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila; i) com véu exterior/parede rugosa, micrópila e micrópila lateral; j) Com capuz polar, micrópila e micrópila lateral; k) Com véu exterior/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral.

Tabela 3. Análise estatística das comparações de médias de oocistos e esporocistos relacionados a caracteres taxonômicos aleatoriamente presentes ou ausentes em oocistos de *Eimeria patagioenasae*.

Dimensões morfométricas		Características							
		véu exterior/parede áspera		capuz polar		micrópila		micrópila lateral	
		presente(n=15)	ausente (n=25)	presente (n=19)	ausente (n=21)	presente (n=31)	ausente (n=9)	presente (n=14)	ausente (n=6)
Oocisto	Diâmetro maior(µm)	26.0 (22-30) ^a	26.2 (21-31) ^a	26.9 (23-31) ^a	25.5 (21-31) ^a	26.1 (21-31) ^a	26.2 (22-31) ^a	26.6 (23-31) ^a	25.9 (21-31) ^a
	Diâmetro menor (µm)	20.0 (18-22) ^a	20.1 (16-23) ^a	19.7 (16-22) ^a	20.4 (18-23) ^a	20.0 (16-22) ^a	20.4 (19-23) ^a	20.0 (16-22) ^a	20.1 (16-23) ^a
	Índice morfométrico	1.3 (1.1-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a	1.4 (1.1-1.6) ^a	1.3 (1.0-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a	1.3 (1.1-1.5) ^a	1.3 (1.2-1.5) ^a	1.3 (1.0-1.6) ^a
	Diâmetro maior(µm)	15.6 (15-17) ^a	14.7 (13-18) ^a	15.1 (13-18) ^a	15.0 (13-17) ^a	14.9 (13-18) ^a	15.4 (15-17) ^a	15.7 (14-17) ^a	14.8 (13-18) ^a
Esporocisto	Diâmetro menor (µm)	7.6 (6-8) ^a	7.2 (7-8) ^a	7.4 (7-8) ^a	7.3 (6-8) ^a	7.3 (7-8) ^a	7.4 (6-8) ^a	7.7 (7-8) ^a	7.2 (6-8) ^a
	Índice morfométrico	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a	2.1 (1.9-2.3) ^a	2.0 (1.9-2.2) ^a	2.0 (1.8-2.3) ^a

^aTodas as médias (mesmas letras) dentro de cada coluna de caracteres taxonômicos foram equivalentes (P>0.01).

3.3 Análise molecular e filogenética

Análises moleculares de oocistos individuais recuperados de *P. plumbea* com diferentes combinações de caracteres taxonômicos (morfortipos) revelaram a presença de sequências eimerídeos diferindo de outros coccídios depositados no banco de dados do GenBank.

No *locus* COIBF1, oocistos de três morfortipos distintos (subesferoidal com micrópila; ovoidal com capa de micrópila e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral) foram 100% idênticos entre si e 99% semelhantes a *Isospora* spp.

Eimeria columbinae Ortúzar-Ferreira; Berto, 2019, que foi descrita a partir de rolinha-roxa, *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) no sudeste do Brasil, foi a espécie eimeriana mais próxima, com 98,2% de similaridade. *Eimeria labbeana* (Labbe, 1896) Pinto, 1928 e *E. ferreirai*, que são duas outras *Eimeria* spp., registradas em Columbiformes, sequenciadas para esse mesmo *locus* COIBF1, apresentaram 93,5% e 91,6% de similaridade, respectivamente.

No *locus* MACOIII, um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral apresentou 99,1% de similaridade com um oocisto do mesmo morfortipo, exceto pela presença do véu externo com aspecto de parede rugosa.

Em contraste, este mesmo oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral teve 99,8% de similaridade com um oocisto subesferoidal com apenas uma micrópila na extremidade longitudinal. Destes oocistos, as sequências mais próximas depositadas no GenBank neste *locus* MACOIII foram de *Eimeria dispersa* Tyzzer, 1929 e *Eimeria innocua* Moore; Brown, 1952, que são parasitas de perus, juntamente com alguns *Isospora* spp, com similaridade de 93%.

No *locus* MAVCOXI, os mesmos oocistos elipsoidais do mesmo morfortipo, com exceção do véu externo/parede rugosa, foram 100% idênticos entre si. Em comparação com as sequências depositadas no GenBank, as mais próximas foram *E. innocua* e *E. dispersa*, com 92,6% e 91,8% de similaridade, respectivamente.

No *locus* MARI apenas o oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral foi bem-sucedido na amplificação e sequenciamento. Em comparação com as sequências do GenBank, novamente *E. innocua* e *E. dispersa* foram as mais próximas, com 92,9% de similaridade.

A análise filogenética baseada nos *loci* COIBF1, MACOIII, MAVCOXI e MARI incluiu sequências de coccídios disponíveis no GenBank (**Figuras 9 - 12**). Uma *Choleoeimeria* sp. (KT203395) de uma cobra-real da pradaria *Lampropeltis calligaster* (Harlan, 1827) foi usada como grupo externo.

Na árvore filogenética construída a partir do *locus* COIBF1 (**Figura 9**) os oocistos polimórficos de *P. plumbea* formaram um grupo monofilético com *Isospora* spp, de passeriformes, estando em polifilia com as demais *Eimeria* spp. de Columbiformes. Já na árvore filogenética construída a partir do *locus* MACOIII (**Figura 10**) as sequências do presente estudo estavam em um grande clado com *Eimeria* spp., de galinhas, perus, gansos, coelhos, cavalos, além de *Isospora* spp., de passeriformes e outros coccídios eimerídeos.

Finalmente, nas árvores filogenéticas construídas a partir dos *loci* MAVCOXI e MARI (**Figuras 11, 12**), grupos monofiléticos com *E. innocua* e *E. dispersa* foram formados. Essa relação foi razoavelmente apoiada em todas as análises.



Figura 9. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (COIBF1) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números dos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subsferoidal-c', 'ovoidal-e' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subsferoidais com micrópila; ovulais com capuz polar e micrópila; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.



Figura 10. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MACOIII) que cobre parcialmente o gene *cox3* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'subsferoidal-c', 'elipsoidal-k' e

'elipsoidal-i' referem-se a oocistos subesferoidais com micrópila; elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capuz polar, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.



Figura 11. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MAVCOXI) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. Os morfotipos 'elipsoidal-k' e 'elipsoidal-i' referem-se a oocistos elipsoidais com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; e elipsoidal com capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral; respectivamente.



Fig. 12. Relação filogenética de *Eimeria patagioenasae* de pombas-amargas *Patagioenas plumbea* inferida por análise bayesiana para um locus (MARI) que ocupa fragmentos de pequenas e grandes subunidades rDNA do genoma mitocondrial. Os números nos nós, mostram valores de *bootstrap* derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Somente suportes de *bootstrap* e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos. O morfotipo 'elipsoidal-k' refere-se a um oocisto elipsoidal com véu externo/parede rugosa, capa de micrópila, micrópila e micrópila lateral.

4 DISCUSSÃO

O número mínimo de amostras de hospedeiros visando descrições ou relatos de espécies de coccídios não é consensual ou pré-determinado, como pode ser observado na literatura científica, onde novas espécies de coccídios foram descritas até mesmo por uma única ave hospedeira (Berto et al. 2011). Entretanto, quanto maior o número de amostras (de diferentes exemplares, espécies e localidades), maior será a delimitação e precisão da padronização/tipificação de uma espécie de coccídio (Ortúzar-Ferreira et al. 2021; Berto e Lopes 2020).

O baixo número de pombas-amargas *P. plumbea* (*P. plumbea*) capturados e analisados no presente estudo se justifica pela raridade e dificuldade de captura desta pomba no Parque Nacional de Itatiaia/RJ. Após mais de 10 anos de expedições bimestrais no parque, apenas esses 03 (três) exemplares de *P. plumbea* foram capturados nesta área de difícil acesso e trabalho de campo no planalto de altitude do Parque Nacional do Itatiaia. Em qualquer caso, o número muito razoável de oocistos analisados (40) de 02 (dois) das 03 (três) pombas capturadas garantiu um estudo morfológico, estatístico e molecular preciso, até porque os estudos moleculares complementares foram realizados em oocistos individuais.

Os oocistos, identificados e descritos como *E. patagioenasae*, eram extremamente variáveis em tamanho, formato e presença e ausência de vários traços característicos associados à parede do oocisto (**Figuras 2 e 3**). Estas variações foram em grande parte aleatórias; ou seja, não foi possível padronizar/tipificar determinados tamanhos e formas associados à presença/ausência de determinados traços característicos (morfotipos).

Essa afirmação também é apoiada pela regressão linear dos oocistos (**Figura 7**), onde 11 combinações de características diferentes foram distribuídas aleatoriamente ao longo da linha de regressão em oocistos de diferentes tamanhos e formas. Se cada combinação de características associadas à forma/tamanho do oocisto fosse superestimada, 19 diferentes morfotipos/espécies poderiam ser identificados/descritos. Em contrapartida, os esporocistos foram uniformes, morfológica e morfometricamente, dentro de oocistos de morfotipos distintos, como mostrado na **Figura 8**, reforçando a hipótese de uma única espécie nos oocistos observados.

Aliado a isso, os histogramas foram regulares nas frequências distribuídas nas classes de medidas (**Figuras 5 e 6**) e a análise de comparação de médias mostrou que não há diferenças significativas entre oocistos com e sem micrópila, capa de micrópila, micrópila lateral e véu externo/parede rugosa (**Tabela 3**); portanto, indicando fortemente a presença de uma única espécie nas amostras fecais de *P. plumbea*. Algumas espécies eimerianas foram diferenciadas e descritas com base em variações moderadas no tamanho, formato e rugosidade da parede do oocisto, como em Casas et al. (1995) na descrição de 03 (três) novas espécies de *Eimeria* spp. de capivaras, em contraste com Flausino et al. (2014), que redescreveram *Eimeria caviae* Sheather, 1924 com tendo oocistos subesferoidais, ovoides e elipsoidais. No presente trabalho, baseado principalmente em análises morfológicas e estatísticas morfométricas dos oocistos,

uma avaliação e identificação conservadora foi definida, indicando as variações extremas em determinados caracteres taxonômicos como intraespecíficos, ou seja, polimorfismos.

Polimorfismo é uma característica populacional na qual uma única espécie apresenta variações em sua forma, tamanho e outras características; portanto, uma variação em nível de espécie (intraespecífica) (Gardner e Duszynski 1990; Wiens 1999; Amorim 2002; Berto e Lopes 2020).

Em genética de populações, o termo polimorfismo indica uma transitoriedade de alelos onde coexistem dois ou mais alelos do mesmo *locus*; ou seja, polimorfismo são as variações fenotípicas/genotípicas intrínsecas a uma espécie (Amorim, 2002). Entretanto, além desse polimorfismo intrínseco da espécie, outros fatores podem estar associados.

A partir das revisões de Fayer (1980) a Berto e Lopes (2020), vários autores indicam que estresse, nutrição e imunidade do hospedeiro, plasticidade fenotípica, dose infectante, tempo de excreção de oocistos no período pré-patente, drogas anticoccidianas, fatores abióticos associados à esporulação e metodologia de mensuração, podem estar relacionados ao polimorfismo oocisto.

Nesse contexto, destacam-se os seguintes trabalhos: Duszynski (1971) relata um aumento no tamanho dos oocistos de *Eimeria separata* Becker ; Hall, 1931 durante o período pré-patente; Parker e Duszynski (1986) identificaram um polimorfismo extremo em oocistos de *Eimeria reichenowi* Yakimoff; Matschoulsky, 1935, posteriormente relacionada a uma plasticidade fenotípica (Gardner; Duszynski, 1990), que é definida como a capacidade de um único genótipo exibir uma variedade de fenótipos em resposta à variação no ambiente (Pigliucci 2001); Fayer (1980) e Berto e Lopes (2020) sintetizam que os diferentes ambientes selvagens, antropizados e de confinamento dos hospedeiros podem interferir na morfometria e no número de oocistos que são relatados por Gomez et al. (1982) e Berto et al. (2008); Greif et al. (1996) verificaram que a resistência a drogas anticoccidianas pode gerar polimorfismo; Berto et al. (2014) demonstram que em espécies coccídios com oocistos com índice morfométrico (relação L/W) maior 1,1 (geralmente forma ovoide/elipsoidal), a observação de polimorfismo é mais comum, uma vez que a medida dimensional do oocisto (que é tridimensional) é imprecisa quando os oocistos não estão em posição estritamente longitudinal; enquanto nos oocistos subesferoidais (índice morfométrico de 1,0-1,1) essa imprecisão é bastante atenuada. No contexto deste último caso, todos os oocistos ovóides e elipsoidais medidos no presente trabalho foram cuidadosamente verificados e medidos na posição longitudinal, reduzindo ao máximo essa imprecisão morfométrica.

Do ponto de vista evolutivo, o polimorfismo pode representar um processo de especiação em curso, que Wiens (1999) denomina de macroevolução, ou seja, o processo gradual no qual certos caracteres taxonômicos podem ser eliminados ou incorporados na formação de uma nova espécie. Wiens (1999) também afirma que o polimorfismo pode ter um profundo impacto na delimitação das espécies e, conseqüentemente, nos estudos taxonômicos e filogenéticos; portanto, caracteres polimórficos não podem ser negligenciados.

Alguns estudos relatam esse processo polimórfico de especiação em coccídios eimeriídeos: Gardner e Duszynski (1990) observaram polimorfismo em oocistos de *Eimeria opimi* Lambert, Gardner e Duszynski, 1988 em diferentes espécies de tuco-tucos *Ctenomys* spp., na Bolívia, que foram associados a um processo de especiação e adaptação do hospedeiro; Silva-Carvalho et al. (2020) observaram variações morfológicas e genotípicas em *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira e Lopes, 2015 de diferentes espécies de formigueiros, que também foram associadas ao processo de especiação adaptativa a diferentes espécies hospedeiras. Nesse contexto, Berto e Lopes (2020) resumem que as intensas recombinações genéticas em determinados momentos da especiação, principalmente na adaptação a novos hospedeiros, devem gerar caracteres taxonômicos aleatórios dependendo se os genes estão presentes/ativos ou não. Portanto, a possibilidade de *E. patagioenasae* estar

em um processo polimórfico de especiação e adaptação do hospedeiro é proeminente.

Os oocistos de *E. patagioenasae* compartilham alguns caracteres taxonômicos típicos com *E. ferreirai*, como o tamanho e a micrópila na posição longitudinal do oocisto, além de *E. labbeana*, que possui micrópilas longitudinais e laterais. Além disso, *E. ferreirai* possui a mesma localidade que *E. patagioenasae*, tendo seus hospedeiros simpátricos no Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil. Possivelmente *E. patagioenasae* está especiando em uma adaptação a *P. plumbea* de um eimeriano ancestral comum a *Eimeria* spp. de Columbiformes, em um processo onde ocorrem muitas recombinações genéticas levando ao polimorfismo fenotípico observado.

Os resultados moleculares confirmaram a definição de uma única espécie nos oocistos (de diferentes morfotipos) eliminados pelos pombas-amargas *P. plumbea*, uma vez que pequenas divergências genéticas foram observadas apenas no *locus* MACOIII, enquanto para os *locos* COIBF1 e MAVCOXII as sequências foram idênticas entre os diferentes morfotipos. Vale ressaltar que a maior divergência molecular de 0,9% (5 nt; 561/566 identidades) no *locus* MACOIII foi entre oocistos morfologicamente semelhantes (oocistos elipsoides com mais de três características associadas à parede do oocisto), em comparação com divergência molecular de 0,2% (1 nt; 565/566 identidades) entre os oocistos morfologicamente mais dissimilares (oocistos subesferoidais e elipsoidais, amplamente distintos na parede do oocisto). Nesse sentido, entende-se que as pequenas divergências moleculares detectadas no *locus* MACOIII não foram associadas aos diferentes morfotipos, reforçando a decisão do presente trabalho em identificar os diferentes morfotipos como variações intraespecíficas de *E. patagioenasae*. Ao mesmo tempo, as substituições de nucleotídeos no *locus* MACOIII mostram algum polimorfismo genético, que apesar de não ter sido diretamente correlacionado com morfotipos específicos, enfatiza que o polimorfismo morfológico e morfométrico nos oocistos deve ser intrínseco à espécie ou relacionado ao processo de especiação/adaptação do hospedeiro, e não relacionado aos fatores externos mencionados anteriormente. Em contraste com o trabalho atual, Hafeez et al. (2014) nomearam duas *Isospora* spp., morfológica e morfometricamente indiferenciadas, com base em uma divergência molecular de 1,4% (11 nt) em um *locus* de 761 nt do gene *cox1*. A divergência molecular obtida em Hafeez et al (2014) foi razoavelmente próxima à do presente estudo (1,4% vs. 0,9%), mas é importante ressaltar que estes são *loci* distintos e não sobrepostos no DNA mitocondrial. O *locus* utilizado por Hafeez et al. (2014) foi posicionado entre ~1.700–2.500 nt de DNA mitocondrial, o que se sobrepõe parcialmente aos *loci* COIBF1 e MAVCOXII, obtendo-se 100% de identidade entre os morfotipos do presente trabalho (**Figura 1**). Assim, apesar do número moderado de depósitos de sequências coccídios eimerídeos no GenBank, ainda não há consenso ou esclarecimento de qual região gênica do DNA mitocondrial e qual proporção/número de divergência molecular são fundamentais para a delimitação das espécies.

Existem apenas cinco sequências de *loci* do gene *cox1* de *Eimeria* spp., de Columbiformes, depositadas no GenBank. Os primeiros depósitos foram de Yang et al (2016) para *loci* dos genes da subunidade ribossômica pequena (18S) e grande (28S) RNA e *cox1* para uma *Eimeria* sp., recuperada de *Columba livia* Gmelin, 1789, na Austrália. *Eimeria columbinae* foi sequenciada para o *locus* COIBF1 e um *locus* do gene 18S (Ortúzar-Ferreira et al. 2020).

Eimeria ferreirai e *E. chalcopterae* foram descritas com depósitos de sequências no gene *cox1*, e também nos genes 18s e 28s para *E. chalcopterae* (Yang et al. 2020; Oliveira et al., 2020). *Eimeria labbeana* foi suplementada morfológica e teve sequências do *locus* COIBF1 e um *locus* 18S depositados (Oliveira et al. 2021). Por fim, Taroda et al. (2020) depositaram sequências de um *locus* no gene *cox1* de oocistos eimerianos de avoantes *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) no Brasil, mas nenhuma espécie foi morfológica e geneticamente identificada neste trabalho. Assim, *E. patagioenasae* torna-se a quinta espécie nominal registrada para Columbiformes a ter uma identificação molecular.

Análises moleculares de loci dos genes nucleares 18S e 28S foram utilizados no presente estudo, mas não houve sucesso na amplificação, possivelmente devido à metodologia de extração de DNA a partir de um único oocisto que fornece poucas cópias de DNA nuclear, ao contrário da maior quantidade de DNA mitocondrial disponível em cada esporozoíto/oocisto (Dolnik et al. 2009). De qualquer forma, a utilização dos loci dos genes 18S e 28S é mais adequada para estudos evolutivos de eventos mais profundos, enquanto os genes mitocondriais foram considerados o mais adequados para diferenciação e detecção de espécies de eventos evolutivos recentes (Ogedengbe et al. 2011, 2015); portanto, são mais consistentes com os objetivos do estudo atual.

As análises filogenéticas foram inconclusivas, pois não formaram grupos monofiléticos com *Eimeria* spp., de Columbiformes, o que seria um resultado esperado para o *locus* COIBF1, ou porquê não há sequências de eimerianos de Columbiformes depositadas para as mesmas regiões gênicas dos *loci* MACOIII, MAVCOXI e MARI. De fato, o *locus* COIBF1, apesar de ser o melhor-sucedido na amplificação de um oocisto individual, demonstrou ser inadequado para análise filogenética por não apresentar resultados consistentes com dados filogenéticos, morfológicos ou ecológicos (Ortúzar-ferreira et al. 2022).

Por outro lado, os *loci* MACOIII, MAVCOXI e MARI, que possuem sequências mais longas e em outras regiões do DNA mitocondrial (**Figura 1**), apresentaram grupos monofiléticos associados aos seus respectivos grupos hospedeiros (**Figuras 10, 11 e 12**), mostrando-se *loci* com futuro promissor em estudos filogenéticos quando mais coccídios eimerianos forem sequenciados nessas mesmas regiões gênicas. Vale destacar o *locus* MAVCOXI, que apresentou resultados consistentes e bem sustentados na árvore filogenética (**Figura 11**) e pertence ao gene *cox1*, considerado um dos principais genes para delimitação de espécies no chamado 'código de barras da vida' (Ogedengbe 2011).

Conclui-se que a delimitação e descrição das espécies deve ser um processo detalhado e multifatorial, principalmente no caso de espécies extremamente polimórficas, a fim de evitar erros de identificação e descrições inválidas, ao mesmo tempo em que apresenta com maior compreensibilidade e especificidades as características inerentes a uma espécie (Dayrat, 2005). Nesse contexto, “Taxonomia Integrativa” é o nome dado ao uso de múltiplas ferramentas complementares que permitem analisar e inferir sobre um material biológico para descrever a biodiversidade (Dayrat, 2005; Fujita et al., 2012; Hoberg et al., 2015). No caso da identificação de espécies de coccídios eimerídeos, a abordagem multifatorial da análise da morfologia, estatística morfométrica, estudos moleculares e filogenéticos, considerações sobre a biologia e ecologia do parasita e do hospedeiro, como por exemplo: especificidade, sítios de infecção e nichos ecológicos) expressam a 'Taxonomia Integrativa' (Dayrat, 2005; Berto et al., 2014; 2023; Berto (Lopes, 2020). Assim, a abordagem multifatorial do presente trabalho apoiou a definição dos oocistos polimórficos eliminados de *P. plumbea* como uma única espécie, *E. patagioenasae*, tornando esta a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO E. A., THYSSEN P. J., CORDEIRO N. S. *Eimeria curvata* (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95:53–55, 2000.
- ADRIANO E. A., THYSSEN P. J., CORDEIRO N. S. A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. **Acta Protozoologica**, 42:71–73, 2003.
- ALYOUSIF M. S., AL-SHAWA Y. R., AL-ASIRI S. S. *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, 39:383–388, 2009.
- AMORIM D. S. Fundamentos de Sistemática Filogenética. **Holos Editora**: Ribeirão Preto, 2002.
- AYRES M., AYRES M., AYRES D. L., SANTOS A. A. S. **BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas**. Mamirauá: Belém, 2007.
- ATKINSON C. T., THOMAS N.J., HUNTER D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Wiley-Blackwell, Singapore, 2008.
- BALL S. J., DASZAK P., SWINNERTON K. R., JONES C. G., SNOW K.R. A new species of *Eimeria* (Apicomplexa:Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. **African Zoology** 47:369–372, 2012.
- BANDYOPADHYAY P. K., BHAKTA J. N., SHUKLA R. A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoea) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). **Zoos Print Journal** 21:2386–2387, 2006.
- BERTO B. P., FLAUSINO W., ALMEIDA C. R. R, LOPES C. W. G Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese, *Anser anser* L., 1758 from two distinct sites. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 30:215–219, 2008.
- BERTO B. P., FLAUSINO W., MCINTOSH D., TEIXEIRA-FILHO W. L., LOPES C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology** 80:159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>, 2011.
- BERTO B. P., MCINTOSH D., LOPES C. W. G Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia**, Vet 23:1–15, 2014.
- BERTO B. P., LOPES C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **Journal Parasitology**, 106:707–713, 2020.

BIRDLIFE INTERNATIONAL Species factsheet: *Patagioenas plumbea*.
<http://www.birdlife.org>. Accessed 14 April, 2023.

BERTO B. P., MACHADO E. L., HOSSOTANI C. M. D. S., BERETTA B. M. S, SILVA D. R. R, NAKAMURA A. A., MEIRELES M. V. Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): Worldwide distribution, morphological and molecular characterization, revaluations and establishment of junior synonyms. **Systematic Parasitology**, 2023.

CASAS M. C., DUSZYNSKI D. W., ZALLES L. M. Three new eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from Eastern Bolivia and Southern Venezuela. **Journal Parasitology** 81:247–251, 1995.

CHATTERJEE D. K., RAY H. N. *Eimeria kapotei*, from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. Proc 24th, **Indian Science Congress**, 56:512, 1969.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, 85:407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>, 2005.

DOLNIK O. V. The relative stability of chronic *Isoospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, 100:155–160. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>, 2006.

DOLNIK O. V., PALINAUSKAS V., BENSCH S. Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal Parasitology**, 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>, 2009.

DUSZYNSKI D.W. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. **Journal Parasitology**, 57:948–952. <https://doi.org/10.2307/3277841>, 1971.

DUSZYNSKI D. W., WILBER P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal Parasitology**, 83:333–336, 1997.

DUSZYNSKI D. W. Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. **Folia parasitologica**, 68:001, 2021.

FAYER R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Veterinary Parasitology**, 6:75–103, 1980.

FLAUSINO G., LOPES C. W. G, TEIXEIRA-FILLHO W. L., FURTADO T. T., MCINTOSH D, BERTO B. P. Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Acta Protozoologica**, 53:269–276, 2014.

FUJITA M. K., LEACHÉ A. D., BURBRINK F. T., MCGUIRE J. A., MORITZ C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, 27:480–488, 2012.

GARDNER S. L., DUSZYNSKI D. W. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. **Journal Parasitology**, 76:805–811, 1990.

GOLEMANSKY V. (1976) Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. **Acta Protozoologica**, 15: 399–404, 1976.

GOMEZ F. M., NAVARRETE I., RODRIGUEZ R. L. Influence of environmental factors on different populations of *Isospora lacazei* Labbe 1893 (Protozoa: Apicomplexa). **Revista Ibero-latinoamericana de parasitología**, 42:185–196, 1982.

GREIF G., STEPHAN B., HABERKORN A. Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. **Parasitology Research**, 82:706–714, 1996.

HAFEEZ M. A., STÁSIK I., DELNATTE P., EL-SHERRY S., SMITH D. A., BARTA J. R. Description of two new *Isospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Parasitology Research**, 113:3287–3297, 2014.

HOBERG E. P., AGOSTA S. J., BOEGER W. A., BROOKS D. R. (2015) An integrated parasitology: revealing the elephant through tradition and invention. **Trends in Parasitology**, 31:128–133, 2015.

ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 14 April 2023.

ICZN International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin Zoological Nomenclature**, 69:161–169, 2012.

JAMRIŠKA J., MODRÝ D. A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae). **Acta Protozoologica**, 51:329–333, 2012.

KUMAR S., STECHER G, LI. M., KNYAZ C., TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35:1547–1549, 2018.

MCQUISTION T. E. *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida galapagoensis*). **Transactions of the American Microscopical Society**, 110:178–181, 1991.

OLIVEIRA M. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., ORTÚZAR-FERREIRA C. N., MARONEZI C., THODE-FILHO S., CARDOZO, S. V., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., BERTO B. P. *Eimeria ferreirai* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil. **Zootaxa** 4821:148–160, 2020.

OLIVEIRA M. S., RAMILO D.W., MELLO E. R., CARDOZO S. V., CAETANO I., BRAZIO E., FONSECA I. P., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., BERTO B. P. Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928

(Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal. **Parasitology Research**, 120:3569–3580, 2021.

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., OLIVEIRA M. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., FRANCO H. A., THODE-FILHO S., OLIVEIRA A. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Coccidia of Columbiformes of the World: A taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. **Parasitology Research**, 119:329–333, 2020.

MELLO D. J. M, MELLO G. J. M, MALLET-RODRIGUES F., LIMA L.M. Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação. **Editoração Irmãos Mello**, Rio de Janeiro, 2020.

MITRA A. N, DAS-GUPTA M. On a species of *Eimeria* (Coccidia–Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. Proc 24th, **Indian Science Congress**, 24:291, 1937.

NORTON C. C., JOYNER L. P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. **Parasitology** 83:269–279, 1981.

NIESCHULZ O. Ueber Kokzidien der Haustauben. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg** 134:390–393, 1935.

OGEDENGBE J. D., HANNER R. H., BARTA J. R. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **International Journal Parasitology** 41:843–850, 2011.

ORTÚZAR-FERREIRA C. N., ANDRADE L. A. S., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., OLIVEIRA M. S., MELLO E. R., CARDOZO S. V., OLIVEIRA Á. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Molecular identification of *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil. **Zootaxa**, 5168, 83–91, 2022.

PARKER B. B., DUSZYNSKI D. W. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. **Journal Parasitology**, 72:602–604, 1986.

PIGLIUCCI M. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. The Johns Hopkins **University Press**, Baltimore, 2001.

PINTO C. Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa). **C. R. Seances Society Biology** 98:564–1565, 1928.

RAY D. K. On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae*, from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). **Journal Parasitology**, 38:546–547, 1952.

RIDGELY R. S., GWYNNE J. A., TUDOR G., ARGEL M. **Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste. Horizonte**, São Paulo, 2015.

RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D. L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M. A., HUELSENBECK J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Parasitology**, 61:539–542, 2012.

SAMPAIO I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. **FEP MVZ Editora**, Belo Horizonte, 2002.

SICK H. Ornitologia Brasileira. **Nova Fronteira**, Rio de Janeiro, 1997.

SILVA-CARVALHO L. M., GENOVEZ-OLIVEIRA J. L., OLIVEIRA M. S., OLIVEIRA Á. A., LIMA V. M., FERREIRA I., BERTO B. P. Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitataiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 2020.

SILVA, RODRIGUES, LOPES, BERTO, LUZ, FERREIRA; LOPES, (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, 97:847–855, 2015.

TARODA A., BARROS L. D., SEIXAS M., CARDIM S. T., SASSE J. P., MINUTTI A. P., VIDOTTO O., GARCIA J. L. First molecular detection of *Eimeria* spp. in eared doves (*Zenaida auriculata*) from Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 41:1259–1266, 2020.

TAYLOR M. A., COOP R. L., WALL R. L. **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017.

VARGHESE T. *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the greenwinged ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea. **Journal Parasitology**, 64:312–314 <https://doi.org/10.2307/3279680>, 1978.

VARGHESE T. Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. **Parasitology** 80:183–187, 1980.

WIENS J. J. Polymorphism in Systematics and Comparative Biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 30:327–362, 1999.

WILLIAMS R. B., THEBO P., MARSHALL R. N., MARSHALL J. A. Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, 76:69–76, 2010.

YABSLEY M. J., BAILEY K., ADAMS H. C. A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, *Zenaida macroura* (Columbiformes: Columbidae). **Comparative Parasitology**, 82:231–234, 2015.

YANG R., BRICE B., ELLIOT A., RYAN U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. **Experimental Parasitology**, 166:124–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.009>, 2016.

YANG R., BRICE B., BERTO B. P., RYAN U. M. Morphological and genetic characterization of *Eimeria chalcopterae* (Apicomplexa: Eimeriidae) in a common bronzewing pigeon (*Phaps chalcoptera*) (Latham, 1790) in Western Australia. **Parasitology Research**, 119:3729–3737. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06844-8>, 2020.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Após a obtenção dos resultados deste estudo pode-se concluir o seguinte:

- 1- É recomendável que a descrição de espécies coccidianas seja feita primariamente a partir do estudo morfológico de oocistos e que a identificação molecular complemente confirmando a identificação e delimitação das espécies, além de fundamentar o estudo filogenético.
- 2- A caracterização molecular de coccídios de Passeriformes mostram que sequências mais longas e múltiplos genes são mais conclusivos nas análises filogenéticas;
- 3- Com base nas características morfológicas e moleculares, *I. feroxis* foi redescrita documentando um novo hospedeiro, *T. sulphurescens*, e uma nova localidade, o Parque Nacional do Itatiaia, além do hospedeiro-tipo *M. Ferox* na Ilha da Marambaia, sudeste do Brasil.
- 4- Uma pequena sequência de apenas 250 bp talvez não permita maior resolução no estudo filogenético;
- 5- Sequências com mais de 600 bp de outras regiões do gene COI, como as geradas pela *primer* JAV (Genovez-Oliveira et al., 2020), podem apresentar melhores estimativas filogenéticas no futuro;
- 6- O *primers* JAV não teve sucesso na amplificação das amostras no estudo de Mello et al., (2022); no entanto, tem sido demonstrado em qualquer caso, que genes mitocondriais, como o COI, são mais adequados para trabalhar com oocistos individuais, pois o número de cópias de DNA mitocondrial é muito maior do que o número de cópias de DNA nuclear, favorecendo assim a amplificação de genes mitocondriais
- 7- *Isospora basileuterusi* foi considerada como nova espécie para a ciência, sendo a quinta espécie descrita da família Parulidae e a primeira molecularmente caracterizada através do sequenciamento do gene COI.
- 8- Baixas densidades e a ausência de sinais clínicos observados nos espécimes de aves capturados em diferentes momentos no Parque Nacional do Itatiaia, é compatível com o bom estado de conservação do parque;
- 9- O *primer* utilizado para amplificar e sequenciar a região gênica de 250 pb de COI tem sido considerado inadequado para estudos filogenéticos, embora esteja sendo razoavelmente apropriado para a delimitação de *Isospora* spp. de passeriformes até então;
- 10- *I. leptopogoni* foi considerada nova para a ciência, sendo a terceira espécie descrita de Rhynchocyclidae e a sétima registrada na parvordem Tyrannida;

- 11- *Eimeria patagioenasae* pode ser distinguida de todas as outras 21 espécies eimerianas por ser a única a apresentar capuz polar cobrindo sua micrópila superior, além da presença de um véu externo na parede externa dos oocistos.
- 12- Potencialmente *E. patagioenasae* está em um processo polimórfico de especiação e adaptação à *P. plumbea* a partir um eimeriano ancestral comum a *Eimeria* spp. de Columbiformes.
- 13- *Eimeria patagioenasae* é a vigésima segunda descrição eimeriana de Columbiformes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese abordou a caracterização, descrição morfológica e molecular de diferentes espécies coccídianas de aves silvestres e redescrição morfológica, com complementação de diagnóstico molecular de uma espécie já conhecida pela ciência. Alguns dos resultados aqui descritos, trazem informações importantes e ineditismo, como a descoberta das espécies *I. basileuterusi*, *I. leptopogoni* e *E. patagioenasae* apresentadas nos capítulos II, III e IV, respectivamente, e a adição de novos caracteres taxonômicos à *I. feroxis* a partir de um novo hospedeiro *T. sulphurescens*.

Baseado no presente estudo, fica demonstrado que a identificação molecular é uma ferramenta de complementação de grande importância diante de tantas variáveis que dificultam a taxonomia, como polimorfismos e baixo número de amostras, por exemplo.

Por último, outras pesquisas poderão ser realizadas, buscando conhecer melhor a ecologia dos coccídios, promovendo descrições, redescrções e descobertas com maior riqueza de detalhes e informações.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO", protocolada sob o CEUA nº 6606250616, sob a responsabilidade de **Bruno Pereira Berto e equipe; Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 17/10/2016.

We certify that the proposal "TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIA FROM WILD BIRDS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL", utilizing 500 Birds (males and females), protocol number CEUA 6606250616, under the responsibility of **Bruno Pereira Berto and team; Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/17/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2016](#) a [08/2019](#)

Área: [Biologia Animal](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 240 meses](#)

N: [500](#)

Linhagem: [não se aplica](#)

Peso: [10 a 10000 g](#)

Resumo: A Mata Atlântica é um dos biomas mais importantes para ser preservado na biodiversidade do planeta, sendo as regiões das baixadas do litoral do Sudeste brasileiro, onde está inserido o Estado do Rio de Janeiro, as mais prioritárias para conservação. A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as principais ameaças, as quais, além dos impactos diretos a fauna, flora e microbiota, indiretamente favorecem a transmissão de parasitas e a susceptibilidade das aves. Neste contexto, surge a importância do conhecimento dos parasitas de aves silvestres, principalmente de alguns grupos pouco estudados, como os protozoários coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida), os quais são de extrema importância, tanto em termos de biodiversidade, quanto em sua dinâmica e especificidade. Neste sentido, este projeto visa identificar e quantificar as espécies de coccídios de aves silvestres em áreas de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, os quais fomentarão estudos complementares sobre a dinâmica do parasitismo entre famílias, hábitos, condições ambientais, etc. As expectativas são que os estudos dos oocistos revelem espécies novas, redescrições e novos hospedeiros, verificando a transmissão de coccídios entre aves de famílias distintas e possibilitando a elaboração de chaves dicotômicas de identificação. As distintas características ambientais e diferentes nichos ecológicos poderão influenciar na distribuição das espécies de coccídios, densidades e nas morfologia e morfometria dos oocistos. Desta forma, espécies distintas, padrões morfométricos e/ou morfológicos dos oocistos, e densidades serão associadas a cada condição ambiental, dado biométrico/biológico e nicho ecológico da ave hospedeira. Finalmente, as identificações e/ou elevadas densidades em determinada família, espécie ameaçada/endêmica ou aves em determinado ambiente poderão orientar ou priorizar a conservação de determinada ave e/ou localidade.

Local do experimento: Ambiente Silvestre

Seropédica, 17 de outubro de 2016



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro



Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi APROVADO o protocolo de número 021/2019 intitulado "TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO", encaminhado pelo pesquisador Dr. Bruno Pereira Berto do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Informamos que este parecer foi emitido em reunião ordinária da CEUA | UNIGRANRIO realizada no dia 28 de agosto de 2019, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Vigência: Setembro/2019 a Agosto/2022
Atividade: Captura e coleta de amostras fecais
Número SISBIO: 42798-2
Grupo animal: Aves silvestres (várias espécies)

DECLARATION OF APPROVAL

We hereby declare that protocol number 021/2019 entitled "TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIANS: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPECIES IN WILD BIRDS IN SOUTHEASTERN BRAZIL" has been APPROVED. This protocol was sent by Dr. Bruno Pereira Berto, Department of Animal Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). Please be informed that this opinion was delivered at the regular meeting of CEUA | UNIGRANRIO held on August 28, 2019, after evaluation by the plenary of that Committee.

Sergian Vianna Cardozo
Coordenador CEUA | UNIGRANRIO

Prof. Sergian V. Cardozo
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
UNIGRANRIO





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	02/2020	09/2022
2	Levantamento bibliográfico	09/2019	09/2022
3	Estudo estatístico	09/2020	09/2022
4	Identificação morfológica e molecular	10/2019	09/2022
5	Captura de aves e coleta de amostras	09/2019	09/2022
6	Processamento das amostras	10/2019	09/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Mariana de Souza Oliveira	Bióloga (Doutoranda PPGBA)	152.850.237-00	Brasileira
2	Carlos Nei Ortúzar Ferreira	Bolsista IC (Discente de Graduação de Veterinária)	028.349.762-95	Brasileira
3	Jhon Lennon Genovez de Oliveira	Biólogo (Mestrando PPGBA)	142.851.307-85	Brasileira
4	Lucas de Assis Silva Andrade	Biólogo (Doutorando PPGBA)	147.520.527-92	Brasileira
5	Carla Maronezi	Veterinária	316.357.128-07	Brasileira
6	Sergian Vianna Cardozo	Veterinário (Professor UNIGRANRIO)	082.157.777-83	Brasileira
7	Ericson Ramos de Mello	Biólogo (Doutorando PPGCV)	113.246.467-64	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 1/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa (Iama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
3	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
8	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 2/9



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 16:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50	
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05	

Observações e ressalvas

12	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/agen .
----	---

Outras ressalvas

1	<p>1. Esta autorização não exonera seu titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres. É obrigatório ao pesquisador portar autorização de anilhamento durante as expedições de campo que envolvam essa atividade.</p> <p>2. O intervalo máximo de tempo para a vistoria de cada rede não pode ultrapassar 20 minutos, se a área for enclausurada. Caso a área seja bem sombreada, os intervalos devem ser de 45 minutos, no máximo, de modo a evitar maior estresse aos animais.</p> <p>3. O número máximo de redes armadas não deve ultrapassar 10 unidades para cada visitador experiente presente.</p>	CEMAVE Cabedelo-PB
2	<p>- Comunicar ao PARNA S. Bocaina, com antecedência de 15 dias, quando serão feitas coletas/registros/fotografias de dados e informações no interior do Parque e em que localidade; e para solicitar apoio/logotipo, entrar em contato com o Parque com 03 semanas de antecedência.</p> <p>- Encaminhar listagem com a localização georreferenciada dos títulos ou dados coletados/registrados no PARNA S. Bocaina, indicando data das coletas/registros.</p> <p>- Encaminhar ao PARNA S. Bocaina cópia (física ou digital) das publicações decorrentes desta pesquisa, com endereço na rede mundial de computadores de onde podem ser encontradas.</p> <p>- Solicita-se a disponibilização de imagens registradas a fim de serem utilizadas em atividades do PARNA S. Bocaina, garantindo-se a indicação da autoria na reprodução.</p> <p>Todas as informações solicitadas e publicações resultantes da execução do projeto no interior do PARNA S. Bocaina deverão ser encaminhadas por meio eletrônico para: pesquisa.pnbocaina@icmbio.gov.br</p>	PARNA da Serra da Bocaina
3	<p>- Em qualquer trilha utilizada durante a realização da pesquisa o pesquisador deverá fixar uma fita em uma árvore contendo o número da pesquisa no SISBIO;</p> <p>- Ao final da pesquisa o pesquisador deverá remover todas as fitas colocadas nas trilhas e outros objetos colocados em meio à floresta;</p> <p>- Todos os pontos, áreas e/ou caminhos de pesquisas deverão ser georreferenciados e os arquivos especiais deverão ser fornecidos à equipe da REBIO União, por email (rebiouniao@gmail.com). Neste caso, o pesquisador deverá fornecer o arquivo georreferenciado do local onde as câmeras serão colocadas, bem como as trilhas de acesso a elas;</p> <p>- Caso o pesquisador não identifique as trilhas utilizadas e forneça os arquivos especiais das áreas de pesquisas, a pesquisa poderá ser suspensa no SISBIO e as marcações ou objetos das pesquisas serão retirados da mata;</p> <p>- Em todos os trabalhos de campo na REBIO União a equipe de pesquisa deverá comunicar previamente à gestão da UC em quais locais estará durante a permanência na UC.</p>	REBIO União

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 3/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Outras ressalvas

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 4/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

4	<p>"Reservas do PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ÓRGÃOS:</p> <p>COVID-19: O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente. Recomendamos a leitura do Guia Elaborado pelo ICMBio, Biodiversidade e COVID19 através do link: https://www.icmbio.gov.br/portalf/mage/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/recomendacoes_biodiversidade_e_covid19_ucrs_e_outros_ambientes_naturais.pdf</p> <p>CONTATO PRÉVIO: dado o grande número de pesquisas em curso no Parque, a grande sobreposição espacial das mesmas e a potencial sobreposição nos focos de coleta de dados, sugerimos que o titular da autorização faça contato prévio <pesquisa.parnaso@icmbio.gov.br>, assim que recebê-la. Isso visa minimizar perda de tempo durante as expedições de campo e um melhor planejamento espacial da coleta de dados, evitando todas as possíveis interferências mútuas.</p> <p>AGENDAMENTO CAMPO / USO DE ESTRUTURAS: mensagem para < alojamento.icmbioteresopolis@icmbio.gov.br> com 15 dias antecedência. Informar nº autorização, total pessoas, datas (chegada e saída), necessidade ou não de alojamento, laboratório, salas etc.</p> <p>ATIVIDADES DIDÁTICAS: os locais de coleta devem ser informados para a Coordenação de Pesquisa do PARNASO de forma que não se sobreponham com outras pesquisas em andamento no Parque. Não está autorizada a coleta de espécimes da fauna e flora ameaçadas de extinção para atividades didáticas.</p> <p>ALTERAÇÕES EM CAMPO: devem ser discretas e no relatório final deve constar que "todo o material da pesquisa foi retirado?".</p> <p>REGISTROS DE ESPÉCIES DE INTERESSE PARA A CONSERVAÇÃO (ex: ameaçadas, novos táxons, interesse comercial, cinegético etc.) localizados em áreas de visitação devem ser informados à gestão do Parque para privilegiar sua proteção.</p> <p>PESSOAS E ATIVIDADES ESTRANHAS (ex: caçadores, visitantes fora da área adequada etc.): devem ser reportadas imediatamente à gestão do Parque (Chefe ou Coordenação de Pesquisa).</p> <p>UTILIZAÇÃO DE MÁQUINAS/MOTORES: devem ser feitos todos os esforços para minimizar a poluição visual e sonora. Não é permitido o uso de motores que derramem, mesmo que em quantidades pequenas, combustível ou óleo.</p> <p>PROCESSAMENTO/ARMAZENAMENTO DE MATERIAL: todo o material de coleta deve ser processado ou em campo ou no laboratório, jamais no alojamento, auditório ou refeitório! Materiais que exalem odores ou que obstruam passagem ou locais de assento devem ser retirados imediatamente e não podem ser armazenados também do lado de fora das estruturas por conta do</p>
---	---

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 5/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

ANIMAIS CAPTURADOS/COLETADOS: O manejo de animais vivos ou mortos devem ser evitados em áreas de visitação/turismo. Só deve ser feito em campo (área sem visitação) ou no laboratório de apoio do Parque.

PLANTAS COLETADAS: duplicatas devem ser depositadas no JBRJ e no Herbário do PARNASO (conforme Plano de Manejo, mas recomenda-se antes consultar Coordenação de Pesquisa do Parque).

DEFESA PÚBLICAS: solicitamos que todas as defesas públicas (graduação, especialização, mestrado e doutorado, além de apresentações em eventos) relacionadas a esta autorização sejam, quando possível, comunicadas à gestão do Parque para que gestores possam conhecer os debates acerca dos dados que estão sendo produzidos pelas pesquisas feitas no PARNASO. Pedimos que as mensagens sejam enviadas para: pesquisa.parnaso@icmbio.gov.br, parnasos@icmbio.gov.br

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 6/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Ilha da Marambaia	Mangaratiba-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Condomínio Parque das Águas	Guapimirim-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Fragmentos de Mata Atlântica no distrito de Cacaria	Pirai-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Área de Relevante Interesse Ecológico Floresta da Cicuta	Volta Redonda-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
5	RPPN Reserva Porangaba	Itaguaí-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
6	Parque Nacional da Serra da Bocaina	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
7	Campus IFRJ Pinheiral	Pinheiral-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
8	Fragmentos de Mata Atlântica no distrito de Santa Rita de Cássia	Barra Mansa-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
9	Floresta Nacional Mario Xavier	Seropédica-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
10	Campus UFRRJ Seropédica	Rio de Janeiro-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
11	Parque Nacional da Serra dos Órgãos	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
12	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dentro de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Captura de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal
5	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
6	Marcação de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Marcação de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-
3	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 7/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Fezes, Penas
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina
3	Método de marcação (Aves)	Anilha de Alumínio (padrão CEMAVE), Anilha metálica (padrão CEMAVE)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 8/9



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0701320620211108

Página 9/9



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras	08/2016	07/2019
2	Estudo estatístico	10/2016	07/2019
3	Captura de aves e coleta de amostras	07/2016	06/2019
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	11/2016	07/2019
5	Identificação dos coccídios	09/2016	07/2019

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 3/3



Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17:35:50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fosfíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
3	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
4	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
5	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
8	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
11	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
12	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
14	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0427980420200629

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17:35:50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Outras ressalvas

1. No caso do uso simultâneo de mais de 10 redes de neblina, o pesquisador deverá estar acompanhado de ao menos uma pessoa experiente na manipulação de aves, a fim de conseguir revisar todas as redes em intervalos menores que 30 minutos.	CEMAVE Cabedelo-PB
---	--------------------

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Classe	Animalia > Chordata > Aves

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0427980420200629

Página 2/3



Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17: 35: 50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0427980420200629

Página 3/3

Isospora oliveirai n. sp. (Chromista:
Miozoa: Eimeriidae) from the Greenish
Schiffornis Schiffornis virescens
(Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni:
Tityridae) in South America

**Carlos Nei Ortúzar-Ferreira, Jhon
Lennon Genovez-Oliveira, Mariana de
Souza Oliveira, et al.**

Acta Parasitologica

ISSN 1230-2821

Volume 65

Number 4

Acta Parasit. (2020) 65:843-851

DOI 10.1007/s11686-020-00237-8

 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Isoospora oliveirai n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira¹ · Jhon Lennon Genovez-Oliveira² · Mariana de Souza Oliveira² ·
Ericson Ramos de Mello³ · Sergio Thode-Filho⁴ · Águida Aparecida de Oliveira⁵ · Viviane Moreira de Lima⁶ ·
Ildemar Ferreira⁶ · Bruno Pereira Berto⁶ 

Received: 24 April 2020 / Accepted: 27 May 2020 / Published online: 3 June 2020
© Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2020

Abstract

Background Coccidia are obligatory intracellular parasites with at least one intestinal phase in their life cycles, being *Isoospora* Schneider, 1881 the main coccidian genus related to the order Passeriformes. However, there is no record of isosporans from the passerine family Tityridae, which is the family of the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838).

Purpose This study aimed to examine the faeces from a greenish schiffornis *S. virescens* captured in the Itatiaia National Park, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil, to determine what coccidian parasites were present.

Methods Only one specimen of *Schiffornis virescens* was captured with mist nets. Coccidian oocysts were recovered from the fecal samples by flotation in Sheather's saturated solution. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made in optical microscopy and digitally edited. The molecular analysis included the study of the sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene, with phylogenetic reconstructions based on the Neighbor-Joining and Maximum Likelihood analysis.

Results An *Isoospora* sp. considered as new to science is described and identified from *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838). *Isoospora oliveirai* n. sp. has oocysts that are subspheroidal, 26.0 × 24.8 μm, with rough, bilayered wall, c. 2.5 μm thick. Micropyle and oocyst residuum absent, but one to six polar granules are present. Sporocysts lemon-shaped, 18.1 × 10.9 μm. The Stieda body is knob-like to half-moon-shaped and sub-Stieda is rounded. Sporocyst residuum is present, composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies and nucleus. Molecular analysis at the COI gene exhibited similarity of 97% with *Isoospora serinuse* Yang, Brice, Elliot et Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758), and *Isoospora* spp. from great tits *Parus major* (Linnaeus, 1758) and European robins *Erithacus rubecula* (Linnaeus, 1758).

Conclusion Based on the morphological and molecular features, *I. oliveirai* is considered as new to science and the first coccidian species recorded from Tityridae.

Keywords Morphology · Molecular biology · Taxonomy · Phylogeny · Coccidia · Oocysts · Neotropical birds · Suboscines · Tityridae · Parque Nacional do Itatiaia

✉ Bruno Pereira Berto
berto.ufrrj@gmail.com

¹ Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Brazil

⁵ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro CEP 23890-000, Brazil

Introduction

Coccidia is a subclass of the Infraphylum Apicomplexa, which is characterized as obligatory intracellular parasites with at least one intestinal phase in their life cycles [1, 2]. They have worldwide distribution and a biological cycle consisting of merogony, gametogony and sporogony [3]. Among many genera, *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eucoccidiorida) is a coccidian genus of the family Eimeriidae that is widely found in birds, especially in the order Passeriformes [4, 5].

The greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) is a passerine bird belonging to the family Tityridae. It is endemic to the Atlantic Forest inhabiting alone or in pairs the understory stratum, where it feeds on fruits and insects. It is also a species sensitive to forest fragmentation with low to medium abundance in its habitats [6, 7]. Besides Brazil, this species also is distributed in Argentina and Paraguay [8].

The coccidian parasitism in wild birds is widely reported in the scientific literature [4]; although clinical signs are hardly observed when these hosts are in their natural habitats [9, 10]. This context is widely observed in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), which is a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira, Southeastern Brazil [11]. Birds in the Itatiaia National Park have often been reported to be parasitized by coccidians in the last years, but always without perceptible clinical signs of coccidiosis [12–15].

The current study aimed to examine the faeces from a greenish schiffornis *S. virescens* captured in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in Southeastern Brazil, to determine what coccidian parasites were present.

Materials and Methods

Sample Collection

In May 2017 an expedition was conducted in the Itatiaia National Park (22°27'20"S, 44°36'28"W) to capture wild birds with mist nets and collect fecal samples. Among the captured birds, there was only one specimen of *S. virescens*. This greenish schiffornis was kept in an individual box and faeces collected immediately after defecation. After identification of the species, the bird was photographed and released and stool samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v).

Morphological Analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25 °C) for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber [16] and Berto et al. [17]. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular Analyses

Sixteen oocysts carefully identified with the same characteristic features under light microscopy were isolated and resuspended in PBS [18]. DNA was extracted from the oocyst using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. To fully lyse the oocyst, four freeze–thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. [18] and Yang et al. [19]. The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of c.302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 10 µl of 5× Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,

Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6.

DNA Sequence Analyses

The newly generated sequences were compared to those for *Isospora* spp. and other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for *Isospora* spp. at the COI sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 [20]. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

The captured greenish schiffornis *S. virescens* was positive for coccidia. All observed oocysts were characteristic of *Isospora*. This material is described below.

Family Eimeriidae Minchin, 1903
Genus *Isospora* Schneider, 1881

Isospora oliveirai Ortúzar-Ferreira et Berto n. sp. (Figs. 1, 2)

Oocysts ($n = 26$) subspheroidal, $24\text{--}28 \times 23\text{--}27$ (26.0×24.8); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1 (1.05). Wall bilayered, 2.3–2.7 (2.5) thick, outer layer slightly rough, c.2/3 of total thickness. Micropyle and oocyst residuum absent, but one to six polar granules are present, appearing to be membrane-bounded when more than three are present. Sporocysts ($n = 26$) lemon-shaped, $17\text{--}19 \times 10\text{--}11$ (18.1×10.9); L/W ratio 1.6–1.7 (1.65). Stieda body present, knob-like to half-moon-shaped, 2.0×3.5 ; sub-Stieda body present, rounded, 2.5×3.5 ; para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and centrally located nucleus.

Type host: *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Aves: Passeriformes; Tyranni: Tityridae), greenish schiffornis.

Type locality: Parque Nacional do Itatiaia ($22^{\circ}27'20''\text{S}$, $44^{\circ}36'28''\text{W}$), southeastern Brazil.

Type specimens: Photosyntypes, line drawing, and oocysts in 70% ethanol are deposited at the Museu de Zoologia at the

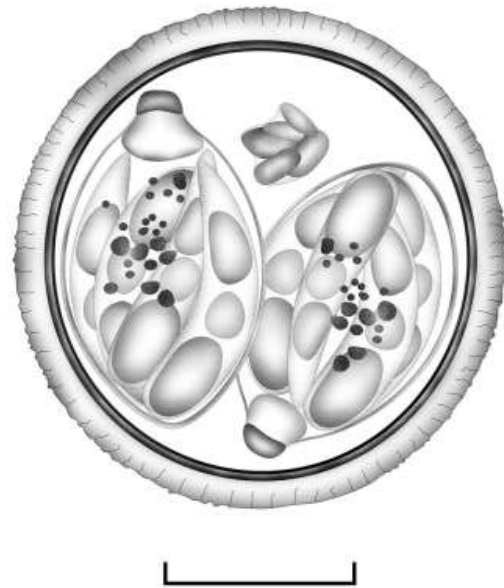


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isospora oliveirai* n. sp. from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. Scale-bar 10 μm

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under the accession number MZURMTZ2020022. Phototypes and line drawings are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-105/2020. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown.

Representative DNA sequence: One representative COI sequence was deposited in the GenBank database under the accession number MT276845.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature [21] details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *Isospora oliveirai* is urn:lsid:zoobank.org:act:46CE4322-1798-477C-A4E2-B2B66FD15279.

Etymology: The specific name is derived from the family name of the Brazilian parasitologist Dr Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, given in his honor for his contribution to the study of helminth and protozoan parasites.

Fig. 2 Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isoospora oliveirai* n. sp. from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. *il* inner and *ol* rough outer layers of the oocyst wall, *pg* polar granule, *sb* Stieda and *ssb* sub-Stieda bodies, *sr* sporocyst residuum, *rb* refractile body. All to same scale. Scale-bar 10 μ m



Remarks: The morphology of *Isoospora* spp. recorded from the parvorder Tyrannida and of *I. oliveirai* recovered from *S. virescens* in the current study are shown in Table 1. *Isoospora araponga* Doležalová, Torres, Fernández et Modrý, 2004 is differentiated from *I. oliveirai*, because it has a smooth oocyst wall, asymmetric sporocysts and Stieda and sub-Stieda bodies barely discernible; while *I. oliveirai* has a rough wall, lemon-shaped symmetric sporocysts, and prominent Stieda and sub-Stieda bodies. *Isoospora lopesi* Silva-Carvalho et Berto, 2018 can also be easily differentiated by its smooth oocyst wall, unique polar granule and flattened Stieda body; which are different in *I. oliveirai* (Table 1). The other coccidian species recorded of tyrannids can be differentiated from *I. oliveirai*, among other aspects, also by the smooth oocyst wall, presence of up to two polar granules, and differences in the shape of the Stieda and Sub-Stieda bodies. Finally, *I. oliveirai* differs from all these coccidian species, because it has the largest oocysts described, to date, in the parvorder Tyrannida (Table 1).

Phylogenetic analysis: DNA amplification of the oocyst of *I. oliveirai* showed a clear band of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 23 sequences for avian *Isoospora* spp. available on GenBank (Fig. 3). *Eimeria tenella* (Railliet et Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isoospora oliveirai* sat separately on the cladogram and had the highest similarity of 97% with *Isoospora serinuse* Yang, Brice, Elliot et Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758), and *Isoospora* spp. from great tits *Parus major* Linnaeus, 1758 and European robins *Erithacus rubecula* (Linnaeus, 1758) [19, 22].

Discussion

As evidenced in studies on taxonomy of coccidians, there is a specificity at the family level in coccidian parasitism within the order Passeriformes [4, 5, 16]. Thus, the taxonomic description of a new species requires a morphological comparison with the coccidian species recorded from the same family of the host; however, there is no description of coccidians in the family Tityridae, where *S. virescens* belongs. In this sense, the coccidian oocysts from the current study were compared with the species described at higher taxonomic levels of the host.

The parvorder Tyrannida brings together the family Pipridae and the superfamilies Cotingoidea (Oxyruncidae, Onychorhynchidae, Tityridae and Cotingidae) and Tyrannoidea (Pipritidae, Platyrinchidae, Tachuridae, Rhynchocyclidae and Tyrannidae) [23]. Only four of these ten families of Tyrannida has coccidian species recorded: (1) *I. araponga* in Cotingidae; (2) *Isoospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira et Lopes, 2009 and *Isoospora atillae* Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira et Lopes, 2015 in Tyrannidae; (3) *Isoospora mionectesi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira et Lopes, 2009 in Rhynchocyclidae and (4) *I. lopesi* in Platyrinchidae [24–28]. As shown in Table 1, *I. oliveirai* is easily differentiated from these coccidian species by several characteristic features, such as: roughness of the outer layer of the oocyst wall, number and arrangement of polar granules, shape of the Stieda and sub-Stieda bodies, in addition to that the oocysts of *I. oliveirai* are larger than all species recorded from the parvorder Tyrannida.

Table 1 Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from the parvorder Tyrannida

Coccidia	Hosts	References	Oocysts					Sporocysts							
			Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium
<i>Isoospora araponga</i> Doležalová, Torres, Fernández et Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot, 1817) (Cotingidae: Cotingidae)	Doležalová et al. [24]	Subspheroidal to ellipsoidal	17–22 (19.5)	14–16 (15.5)	1.1–1.4 (1.3)	Smooth (1.0)	Present, 1–3	Ellipsoidal slightly asymmetric	12–13 (12.5)	7–9 (8.5)	1.3–1.7 (1.5)	Barely visible	Absent	Compact
<i>Isoospora ferax</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira et Lopes, 2009	<i>Myiarchus cinerascens</i> (Gmelin, 1789) (Tyrannidae: Tyrannidae)	Berto et al. [26]	Subspheroidal	18–20 (18.7)	17–20 (18)	1.0–1.1 (1.1)	Smooth (1.2)	Present, usually 2	Ovoidal	11–13 (11.7)	8–10 (8.5)	1.0–1.5 (1.4)	Flattened	Prominent	Diffuse
<i>Isoospora mionectes</i> Berto, Luz, Ferreira et Lopes, 2009	<i>Mionectes rufiventris</i> (Cabanis, 1846) (Tyrannidae: Rhyncocyclidae)	Berto et al. [25]	Ellipsoidal	26–31 (28.3)	19–23 (21.2)	1.2–1.4 (1.3)	Smooth (1.3)	Present, 1 or 2	Elongate ellipsoidal	17–22 (19.7)	10–13 (11.7)	1.6–1.8 (1.7)	Rounded	Prominent	Compact
<i>Isoospora atillae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira et Lopes, 2015	<i>Atilla rufus</i> (Vieillot, 1819) (Tyrannidae: Tyrannidae)	Rodrigues et al. [27]	Subspheroidal to ellipsoidal	18–22 (20.3)	18–21 (19)	1.1–1.2 (1.07)	Smooth (1.3)	Present, 1 or 2	Ellipsoidal	12–15 (13.5)	7–9 (7.9)	1.6–1.9 (1.7)	Knob-like	Rounded to trochoidal	Diffuse

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts	References	Oocysts		Sporocysts										
			Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Isoospora lopesi</i> Silva-Carvalho et Berto, 2018	<i>Platyrrhinus chrysotis</i> (Vicillot, 1818) (Tyrannidae: Platyrhynchidae)	Silva-Carvalho et al. [28]	Subspheroidal to ovoidal	18–24 (20.6)	18–22 (19.7)	1.0–1.2 (1.05)	Smooth (1.5)	Present, single	Ellipsoidal	12–16 (14.4)	8–11 (8.6)	1.5–1.9 (1.7)	Flattened to half-moon-shaped	Rounded	Diffuse
<i>Isoospora oliveirai</i> Ortúzar-Ferreira et Berto n. sp.	<i>Schiffornis virens</i> (Lafresnaye, 1838) (Cotingidae: Tityridae)	Current work	Subspheroidal	24–28 (26.0)	23–27 (24.8)	1.0–1.1 (1.05)	Slightly rough (2.5)	Present, 1–6	Lemon-shaped	10–11 (10.5)	6–7 (6.5)	1.6–1.7 (1.6)	Knob-like to half-moon-shaped	Rounded	Diffuse

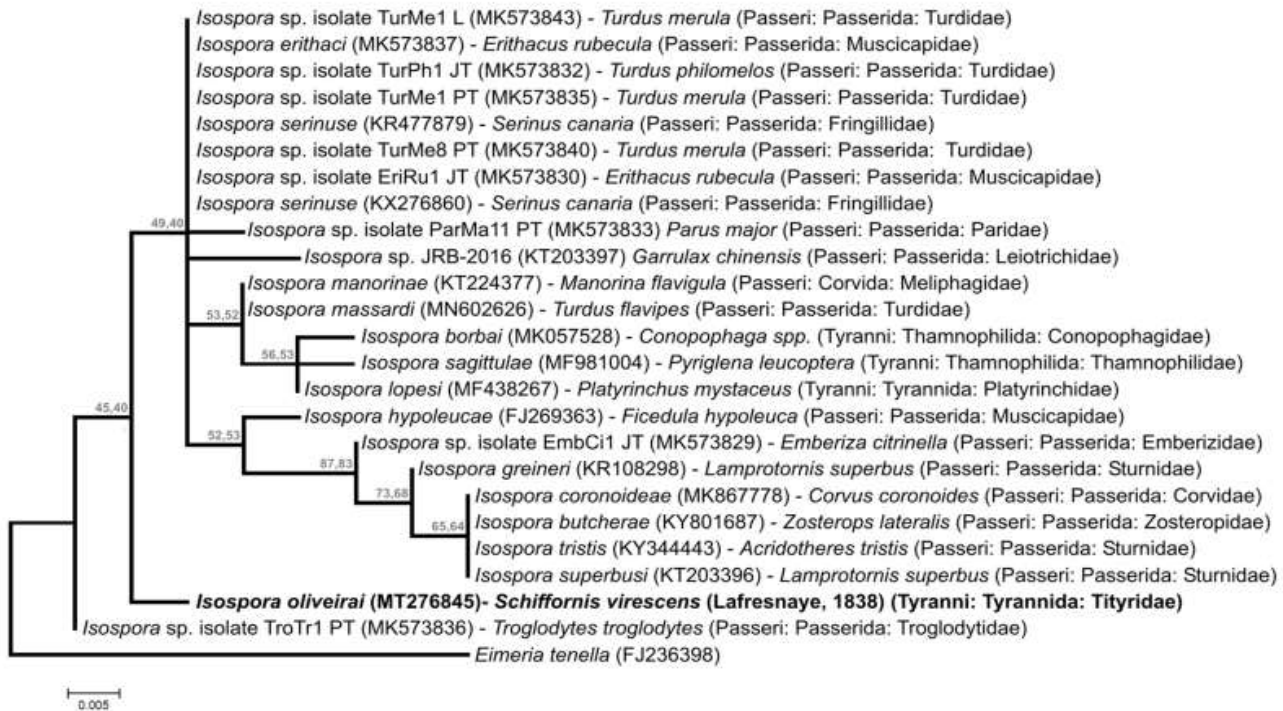


Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 40% shown) for neighbor-joining and maximum likelihood,

respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

The rough oocyst wall observed in *I. oliveirai* is an uncommon morphological feature in *Isospora* spp.; therefore, it becomes the most distinguishable characteristic of this species. This reasoning can be exemplified outside the parvorder Tyrannida: *Isospora machadoae* Pinho, Silva, Rodrigues, Lopes, Oliveira, Luz, Ferreira, Lopes et Berto, 2018 recorded from the family Turdidae and *Isospora borbai* Silva-Carvalho et Berto, 2019, recorded from the family Conopophagidae are the only species within their host-families to have a rough oocyst wall, and, therefore, are easily differentiated from the others species [14, 15].

Phylogenetic analysis did not place *I. oliveirai* in any monophyly; on the contrary, it was separated from a large clade containing several *Isospora* spp. from Passeriformes (Fig. 3). This result can be explained by the close similarities between these *Isospora* spp. in this large clade, which vary between 98 and 100%, whereas *I. oliveirai* differed from these *Isospora* spp. by more than 3%. Anyway, the main inconsistency in phylogeny was in the comparison with *I. lopesi*, which is the only to be classified in the same parvorder (Tyrannida) as *I. oliveirai* among the coccidian species that has COI sequences deposited in Genbank; however, it had a low similarity with *I. oliveirai* of only 95% and sit a distant clade with other coccidian species reported from the Suborder Tyranni (suboscines). Thus, these results are

not conclusive in establishing the phylogeny of *I. oliveirai* and other *Isospora* spp. from Passeriformes; however, these should be more elucidative as more *Isospora* spp. are sequenced for the COI gene and deposited in the Genbank.

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. oliveirai* is considered as new to science and the first coccidian species recorded from Tityridae.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Author Contributions The study was designed by VML, IF and BPB. Field work was performed by CNO-F, JLG-O, MSO, ST-F and BPB. Laboratory procedures for maintenance, recovery, measurements, photomicrographs and isolation of oocysts were performed by CNO-F and MSO. DNA extraction, amplification and sequencing were performed by CNO-F, JLG-O, ERM, AAO and VML. BPB analyzed the data and drew the coccidian oocyst. The manuscript was written by CNO-F and BPB and subsequently revised by all other authors.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). CNO-F has a scholarship from CNPq (Grant/Award number 120107/2018-0). JLG-O and MSO have scholarship from CAPES (Grant/Award number 001). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/

Award number 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award number E-26/202.797/2019).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICM-Bio (license 54951-1) and CEUA/IV/UFRRJ (protocol 6606250616). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Fayer R (1980) Epidemiology of protozoan infection the coccidia. *Vet Parasitol* 6:75–103. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(80\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(80)90039-4)
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD, Kirk PM (2015) Correction: a higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE* 10:e0130114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Duszynski DW, Couch L, Upton SJ (2000) The coccidia of the World. <https://www.w.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>. Accessed 01 Feb 2020
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, Lopes CWG (2011) Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 80:159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto BP, Lopes CWG (2013) Distribution and dispersion of Coccidia in wild passerines of the Americas. In: Ruiz L, Iglesias L (eds) Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease. Nova Science Publishers, New York, pp 47–66
- Stotz DF, Fitzpatrick JW, Parker TA III, Moskovits DK (1996) Aves neotropicales: ecologia e conservação. Universidade de Chicago Press, Chicago
- Anjos L, Collins CD, Holt RD, Volpato GH, Mendonça LB, Lopes EV, Boçon R, Bisheimer MV, Serafini PP, Carvalho J (2011) Padrões de ocupação de abundância de espécies de aves e sensibilidade à fragmentação florestal: implicações para conservação no brasileiro Mata Atlântica. *Biol Conserv* 144:2213–2222. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.05.013>
- Sigríst T (2014) Guia de Campo: Avifauna Brasileira. Avis Brasilis, São Paulo
- Massey JG (2003) Diseases and management of wild Passeriformes. *Semin Avian Exot Pet Med* 12:29–36. <https://doi.org/10.1053/saep.2003.127876>
- Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (2008) Parasitic diseases of wild birds. Wiley-Blackwell, Singapore
- ICMBIO (2018) Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 23 Feb 2020
- Silva LM, Rodrigues MB, Lopes BB, Berto BP, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG (2016) A new coccidian, *Isospora parnaitatiaensis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitol Res* 115:745–749. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4798-z>
- Pinho IF, Rodrigues MB, Silva LM, Lopes BB, Oliveira MS, Ferreira MA, Cardozo SV, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG, Berto BP (2017) Characterization and distribution of *Isospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *J Parasitol* 103:285–291. <https://doi.org/10.1645/16-152>
- Pinho IF, Silva LM, Rodrigues MB, Lopes BB, Oliveira, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG, Berto BP (2018) *Isospora machadoae* sp. nov. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian species from white-necked thrushes *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) of South America. *Zoologia* 35:e24570. <https://doi.org/10.3897/zoologia.35.e24570>
- Silva-Carvalho LM, Oliveira JLG, Oliveira MS, Rodrigues MB, Abreu ST, Ortúzar-Ferreira CN, Franco HA, Thode-Filho S, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2019) *Isospora borbai* n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnatcatchers *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America. *Acta Parasitol* 64:6117–6624. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00079-z>
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian faeces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bull Zool Nomencl* 69:161–169. <https://doi.org/10.21805/bzn.v69i3.a8.161>
- Trefančová A, Kvičero J (2019) *Isospora swecica* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of coccidium from the white-spotted bluethroat *Luscinia swecica cyaneola* (Aves: Passeriformes: Muscicapidae). *Parasitol Res* 118:3043–3051. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06397-5>
- Piacentini VQ, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, Bravo GA, Brito GRR, Naka LN, Olmos F, Posso S, Silveira LF, Betini GS, Carrano E, Franz I, Lees AC, Lima LM, Pioli D, Schunck F, Amaral FR, Bencke GA, Cohn-Haft M, Figueiredo LFA, Straube FC, Cestari E (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Rev Bras Ornitol* 23:90–298
- Dolezalová M, Torres J, Fernández H, Modrý D (2004) *Isospora amponga* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of *Isospora* Schneider from a bare-throated bellbird, *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Cotingidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:829–830. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800008>
- Berto BP, Flausino W, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG (2009) *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. *Acta Parasitol* 54:301–304. <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0053-z>
- Berto BP, Luz HR, Flausino W, Ferreira I, Lopes CWG (2009) New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher

- Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Syst Parasitol* 74:75–80. <https://doi.org/10.1007/s11230-009-9197-3>
27. Rodrigues MB, Silva LM, Lopes BDB, Berto BP, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG (2015) A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. *Zootaxa* 4034:193–196. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4034.1.10>
28. Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Siqueira PB, Rodrigues MB, Lima VM, Berto BP (2018) *Isospora lopesi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Syst Parasitol* 95:455–463. <https://doi.org/10.1007/s11230-018-9795-z>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Redescription and molecular identification of *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira · Ericson Ramos de Mello · Jennifer Oliveira Melo · Mariana de Souza Oliveira · Sergio Thode-Filho · Sergian Vianna Cardozo · Águida Aparecida de Oliveira · Viviane Moreira de Lima · Ildemar Ferreira · Bruno Pereira Berto

Received: 5 June 2020 / Accepted: 23 April 2021 / Published online: 6 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract In the present study *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 is redescribed from the photomicrographs and from new samples from a short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin), which is the type-host in the type-locality, the Marambaia Island in Southeastern Brazil. In addition, the yellow-olive flycatcher *Tolmomyias sulphurescens* Spix is recorded as a new host for this species, in a new locality, the Itatiaia National Park, in

the interior of Southeastern Brazil, providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene. Micropyle and rough oöcyst wall are added to the description of *I. feroxis*, in addition to other details. This is the sixth species identified from subsocial birds (Tyranni) to have a COI gene sequence deposited in GenBank and, although it is not yet possible to make conclusions on the phylogeny

C. N. Ortúzar-Ferreira · J. O. Melo
Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7,
23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

E. R. de Mello
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7,
23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

M. de Souza Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7,
23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

S. Thode-Filho
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Av. República do Paraguai 120,
25050-100 Duque de Caxias, Brazil

S. V. Cardozo
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160,
25071-202 Duque de Caxias, RJ, Brazil

Á. A. de Oliveira
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7,
23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

V. M. de Lima · I. Ferreira · B. P. Berto (✉)
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7,
23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: berto.ufrj@gmail.com

of *Isospora* spp. from Passeriformes by the COI gene, the molecular analysis confirmed the differences between coccidian species from tyrant-flycatchers.

Introduction

Biodiversity in the Neotropical Region is very relevant for researchers around the world, among various aspects, due to its potential and recurring new discoveries (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2008). In this context, the class Aves stands out for its great diversity and exuberance, attracting not only scientists, but also ecotourists, especially birdwatchers (Stotz et al., 1996). Brazil is the second country in the Neotropical region with the largest number of bird species; where, currently, there are 1919 species listed by the Ornithological Records Committee of Brazil (Piacentini et al., 2015). In the context of research on Neotropical birds, there is the study of their parasites, which has been increasingly related to ecology, physiology and conservation of wild species. Among bird parasites, coccidian protozoa stand out as the cause of morbidity and mortality in unfavorable conditions of host and environment, to a commensalism-like in bird populations in conserved and balanced environments (Berto & Lopes, 2020).

Tyrant-flycatchers represent a superfamily, Tyrannoidea (Piacentini et al., 2015), or simply the family Tyrannidae, according to BirdLife International (Del Hoyo & Collar, 2016), which distribution extends across North, Central and South America, being more concentrated in the Neotropical Region. It is currently the largest superfamily/family of the class Aves worldwide, with 450 species recorded. In Brazil, 218 species are listed (Piacentini et al., 2015; Del Hoyo & Collar, 2016). Even with this great diversity, there are few reports of coccidian species from tyrant-flycatchers, when compared to other bird families. In this context, the current study aimed to redescribe *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 from the photosyntypes and from samples of a short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin), which is the type-host in the type-locality, the Marambaia Island in Southeastern Brazil. In addition, the yellow-olive flycatcher *Tolmomyias sulphureus* Spix is recorded as a new host for this species, in a new locality, the Itatiaia National Park, in the interior of

Southeastern Brazil, providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene.

Materials and methods

Sample collection

Between August 2014 and August 2018, 19 expeditions were conducted in different locations in the Itatiaia National Park (22°27'S, 44°36'W), a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO, 2016), to capture wild birds with mist nets and collect faecal samples. A total of seven yellow-olive flycatchers *T. sulphureus* were captured. In addition to the Itatiaia National Park, an expedition in September 2014 was conducted on Marambaia Island (23°3'38.86"S, 43°58'47.56"W), on the coast of the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil, where one short-crested flycatcher *M. ferox* was captured. The birds were kept in individual boxes and faeces collected immediately after defecation. After identification of the species, the bird was photographed and released and faecal samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% ($K_2Cr_2O_7$) solution at 1:6 (v/v).

Morphological analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 days or until ~70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using Corel DRAW® and Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada). All measurements are in micrometres and

are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analyses

An individual oöcyst from a fecal sample of *T. sulphurescens* was isolated from serial dilutions of the oöcysts in drops on a microscope slide using a sterile micropipette. This isolated oöcyst was resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the purified oöcysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oöcyst, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 10 µl of 5× Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 47°C for 45 s, and 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6 (Technelysium Pty Ltd, Queensland Australia).

DNA sequence analyses

The newly generated sequence was compared to those for *Isospora* spp. and other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for *Isospora* spp. at the COI sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7, using ClustalW as alignment algorithm (Tamura et al., 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Obtaining the photosyntypes of Isospora ferox Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009

The photosyntypes of *I. ferox* from *M. ferox* identified in Berto et al. (2009a), which were deposited in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios (<http://rl.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) at UFRRJ under repository number P-30/2009, were required for morphological comparison.

Results

Seven *T. sulphurescens* were examined and five of them (71%), which were captured in the same location in the Itatiaia National Park, known as “Trilha das Borboletas” or “Butterfly Trail” (22°26'57.00”S, 44°36'25.00”W), were positive for coccidia. The short-crested flycatcher *M. ferox* captured in Maramabia Island was also positive for coccidia. All observed oöcysts were morphologically identified as *I. ferox*. This material is described below.

Eimeriidae Minchin, 1903

Isospora Schneider, 1881

Isospora ferox Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009

Type-host: *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Tyrannidae) short-crested flycatcher.

Other host: *Tolmomyias sulphureus* Spix (Aves: Passeriformes: Tyranni: Tyrannoidea: Rhynchocyclidae) yellow-olive flycatcher (present study).

Type-locality: Marambaia Island (23°3'38.86"S, 43°58'47.56"W), Southeastern Brazil

Other locality: Parque Nacional do Itatiaia - Itatiaia National Park (22°26'57.00"S, 44°36'25.00"W), Southeastern Brazil.

Type-specimens: Photosyntypes and line drawing are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-30/2009.

Other specimens (present study): Photomicrographs, line drawing, and oöcysts in 2.5% $K_2Cr_2O_7$ solution (Williams et al., 2010) from *T. sulphureus* are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2020025. Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository numbers 108/2020 (*T. sulphureus*) and 109/2020 (*M. ferox*). Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown; oöcysts recovered from faeces.

Prevalence: 75% (6/8) overall; 71% (5/7) for *T. sulphureus*; and 100% (1/1) for *M. ferox*.

Representative DNA sequence: Representative COI sequences of the oöcysts from *T. sulphureus* were deposited in the GenBank database under the accession number MT563402.

Description (Figs. 1, 2)

Sporulated oöcyst

Oöcysts (n = 81) subspheroidal, 18–23 × 18–23 (20.7 × 20.0); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1 (1.04). Wall bi-layered, 1.3–2.0 (1.7) thick, outer layer with minimal to moderate roughness, c.2/3 of total thickness. Micropyle present, 4.4–9.2 (7.4) wide. Oöcyst residuum absent, but 1–3 (usually 2 bonded) polar granules are present.

Sporocyst and sporozoites

Sporocysts (n = 70) 2, ovoidal to ellipsoidal, 11–15 × 8–10 (13.4 × 9.2); L/W ratio 1.3–1.6 (1.45). Stieda body present, flattened to half-moon-shaped, 0.5–0.7

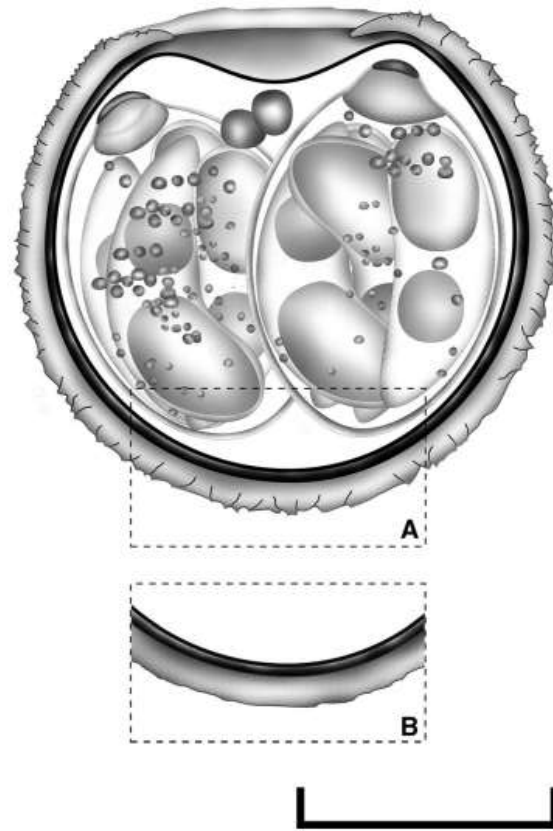


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oöcyst for redescription of *Isospora ferox* from tyrant-flycatchers, highlighting the outer layer of the oöcyst wall with moderate (A) or minimal (B) roughness. Scale-bar: 10 μ m.

× 1.3–2.2 (0.6 × 1.7); substieda body present, rounded to trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9), infrequently with prominence resembling a compartmentalized substieda; parastieda body absent; sporocyst residuum present, composed of spherules of different sizes. Sporozoites 4, vermiform, 10–11 × 3–4 (10.9 × 3.6), with posterior refractile body and centrally located nucleus.

Remarks

Four *Isospora* spp. are recorded from New World tyrant-flycatchers (Table 1). To date, *I. ferox* had the smallest oöcysts among these *Isospora* spp.; however, in the present study, the wide addition of oöcyst measurements from two hosts increased the range of oöcysts measurements, making them compatible with *Isospora attilae* Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 and *Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018. However, *I. ferox* oöcysts

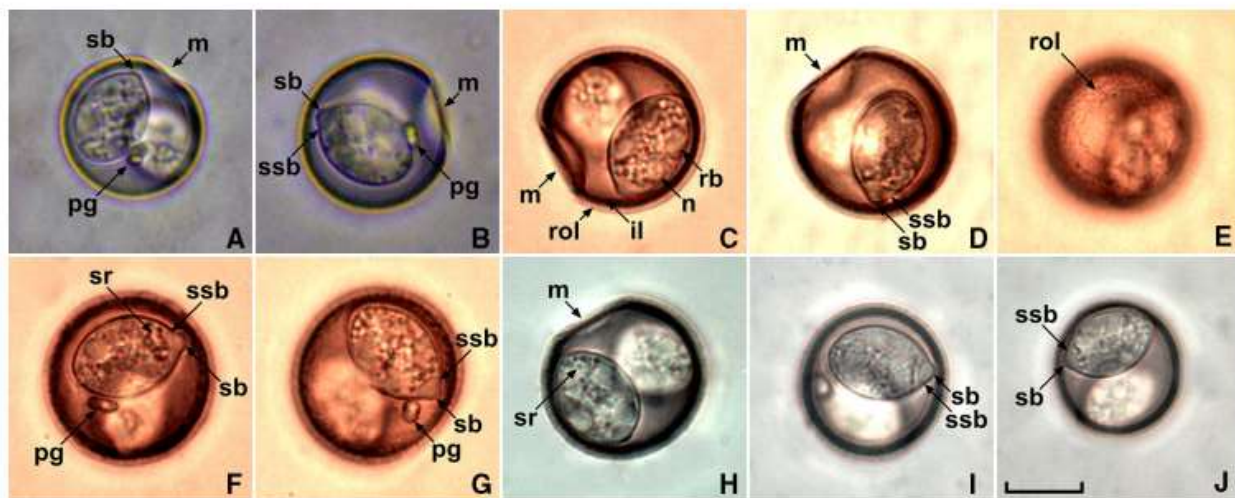


Fig. 2 Sporulated oocysts of *Isospora ferox* from the photosyntypes (A, B) and from new samples of a short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (C–G) and of yellow-olive flycatchers *Tolmomyias sulphurescens* (H–J). Note the inner (il) and rough outer (rol) layers of the oocyst wall; micropyle (m); nucleus (n); polar granule (pg); Stieda (sb) and sub-Stieda bodies (ssb); sporocyst residuum (sr); refractile body (rb). Scale-bar: 10 μ m.

are differentiated from these *Isospora* spp. by the less elongated shape of the sporocysts, smaller and more delicate sub-Stieda body and, mainly, by the presence of the micropyle and rough oocyst wall which were added in the current redescription.

Phylogenetic analysis

DNA amplification of the oocyst of *I. ferox* showed a clear band of *c.*250 bp. Phylogenetic analysis included 20 sequences for avian *Isospora* spp. available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. *Isospora ferox* sat apart into a large clade containing *Isospora* spp. from thrushes, warblers, honeyeaters, buntings, longspurs, starlings, white-eyes, but also containing *Isospora* spp. from suboscine hosts (Tyranni), which is the Suborder of *T. sulphurescens* and *M. ferox*. *Isospora ferox* had the highest similarities of 97% with *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 from the yellow-legged thrush *Turdus flavipes* (Vieillot) and *Isospora manorinae* Yang, Brice, Jian & Ryan, 2016 from the yellow-throated miner *Manorina flavigula* (Gould).

Discussion

The description of coccidian species is fundamentally based on the morphology of the oocysts; although ecological, biogeographical, pathological and molecular complementations are important for the characterisation of a species (Duszynski & Wilber, 1997; Tenter et al., 2002; Berto et al., 2014). In this context, Duszynski & Wilber (1997) established that the identifications must be based on the comparative morphology between the coccidian species recorded in the same family as the host. Since then, the most complete and reliable studies on coccidian taxonomy from wild birds have demonstrated specificity at the host family level (Berto et al., 2013); however, sometimes the number of coccidian species recorded in a host-family is very low or non-existent (e.g., Cardinalidae), making it necessary to compare with coccidian species described from higher taxonomic levels of the host, such as Superfamily, Parvorder or Infraorder. In addition, the divergences in the systems of classification of Aves make it difficult to identify coccidians based on host-family specificity. The classifications of Del Hoyo & Collar (2016) and Piacentini et al. (2015) that supported the present study classify the tyrant-flycatchers as a Family and Superfamily, respectively; therefore, despite this divergence in level and classifications in different families by Piacentini et al. (2015), there were no

Table 1 Comparative morphology of *Isoptora* spp. recorded from New World tyrant-flycatchers (Tyrannoidea)

Species	Host	Reference				Sporocyst								
		Reference	Öocyst	Shape	Size (µm)	Shape index	Polar granule	Wall	Micropyle	Shape	Size (µm)	Shape index	Stitida body	Sub-Stitida body
<i>Isoptora feroxis</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae)	Berto et al. (2009a)	sub-spheroidal	18–20 × 17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.1)	usually 2	low roughness	present	ovoidal	11–13 × 8–10 (11.7)	1.0–1.5 (1.4)	flattened, (0.3 × 1.2)	prominent, (1.2 × 2.5)	diffuse
				× 18.0										
<i>M. ferox</i> 2009	present study	sub-spheroidal	21–23 × 20–23 (21.9)	1.0–1.1 (1.03)	1–3 (usually bonded)	low to moderate roughness	present	ovoidal to ellipsoidal	14–15 × 9–10 (14.8)	1.4–1.6 (1.47)	flattened to half-moon-shaped, 0.5–0.7 × 10.1)	rounded to trapezoidal, 1.0–1.8 × 2.4–3.3 (1.3 × 2.9)	diffuse	
			× 21.4											
<i>Tolmomyias sulphurens</i> Spix (Rhinocyclidae)		Berto et al. (2009b)	ellipsoidal	18–23 × 18–22 (20.5)	1.0–1.1 (1.04)			absent	elongate-ellipsoidal	17–22 × 10–13 (19.7)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 × 1.1)	prominent, (1.4 × 2.1)	compact, subspherical
				× 19.8										
<i>Isoptora mionectesi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2009	<i>Mionectes niventris</i> Cabanis (Rhinocyclidae)	Berto et al. (2009b)	ellipsoidal	23–31 × 19–23 (28.3)	1.2–1.4 (1.3)	1–2	smooth	absent	ellipsoidal	12–15 × 7–9 (13.5)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 × 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 × 4.0)	diffuse
				× 21.2										
<i>Isoptora antilae</i> Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015	<i>Attila riflus</i> (Vieillot) (Tyrannidae)	Rodrigues et al. (2015)	sub-spheroidal to ellipsoidal	18–22 × 18–21 (20.3)	1.0–1.2 (1.07)	1–2	smooth	absent	ellipsoidal	12–16 × 8–11 (14.4)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-shaped, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	diffuse
				× 19.0										
<i>Isoptora lopesi</i> Silva-Carvalho & Berto, 2018	<i>Platyrrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018)	sub-spheroidal to ovoidal	18–24 × 18–22 (20.6)	1.0–1.2 (1.05)	1	smooth	absent	ellipsoidal	12–16 × 8–11 (14.4)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-shaped, (1.0 × 2.5)	rounded, (2.0 × 2.5)	diffuse
				× 19.7										

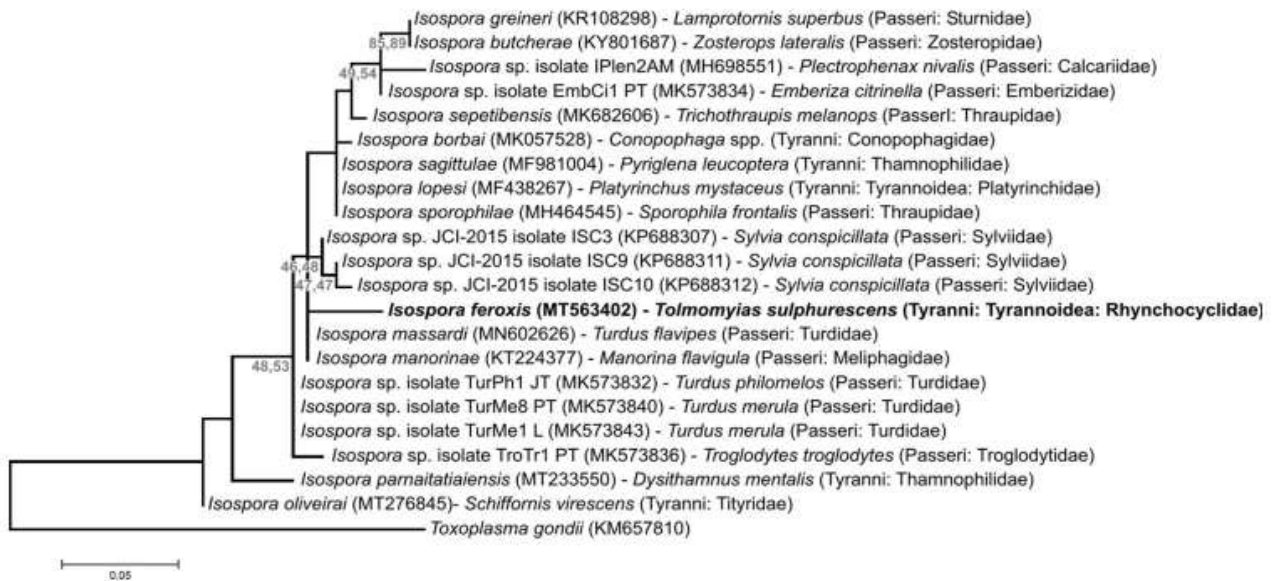


Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1,000 replicates; only values > 40% shown) for Neighbor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

differences in the organization and comparison of coccidians from tyrant-flycatchers that are traditionally related (Berto et al., 2011).

The oöcysts of the original description of *I. ferox* and those of *M. ferox* and *T. sulphurescens* of the present study differed in measures. These morphometric differences were mainly observed from the low number of oöcysts measured from single hosts *M. ferox*, both in Berto et al. (2009a) and in present study (Table 1). In contrast, the 71 measured oöcysts from 5 *T. sulphurescens* reached a wide range of measures, which is compatible with the largest and smallest oöcysts of *M. ferox*. Thus, it can be concluded that *I. ferox* has a wide range of measurements detected when observing oöcysts from several hosts. These differences in the size of oöcysts shed from different hosts are natural and already established in the scientific literature as a result of biological and ecological factors (Duszynski, 1971; Fayer, 1981; Berto & Lopes, 2020).

The redescription from the photosyntypes of *I. ferox* proposed in the present study is based on the observation of oöcysts with micropyle (Fig. 2a, b), which were not identified in the original description by Berto et al. (2009a). Probably, the low number of 10 oöcysts observed in Berto et al. (2009a) must have favored the non-observance of the micropyle, since

this characteristic feature is observed only in certain positions of the oöcysts (Fig. 2e–g, i, j), especially when they are subspherical (Berto et al., 2014). Thus, this redescription highlights the importance of prioritizing the description of coccidian species from a large number of oöcysts, preventing that certain characteristic features are not observed for the description. In this same sense, the original description by Berto et al. (2009a), did not identify oöcysts with a rough wall. In fact, the oöcysts observed in the current study had a low to moderate roughness, and in one of the hosts *T. sulphurescens*, only oöcysts with very low roughness were predominantly observed, similar to the photosyntypes of *I. ferox*. Therefore, these results reinforce that the description of new coccidian species from a single host specimen should be avoided, ensuring that all possible details of a coccidian species are observed.

Isospora ferox is the sixth species identified from suboscine birds to have a deposition of COI gene sequence on the GenBank. Even so, few phylogenetic conclusions are observed from the cladogram shown in Fig. 3. *Isospora ferox* was closer to *Isospora* spp. from thrushes, honeyeaters and warblers than from species of the same parvorder, such as *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, and Superfamily/Family, such as *I. lopesi*. At the same time,

Isospora feroxis was as close to coccidians from the Neotropical region, such as *I. massardi*, as well as to coccidian species related to endemic birds in Oceania, such as *I. manorinae*. In fact, this 257 bp fragment of the COI gene has not been totally suitable for the delimitation of coccidian species of passerines, despite that it was pioneered in the work of Dolnik et al. (2009), it has the largest number of deposits at GenBank and, until recently, it has been recommended for phylogenetic studies (Yang et al., 2015). In this sense, the latest works on molecular characterisation of coccidians of Passeriformes has shown that longer sequences and multiple genes are more conclusive in the phylogenetic analyses (Yang et al., 2021). In any case, the molecular analysis confirmed the differences already observed in the morphology of the oöcysts of *I. feroxis* and *I. lopesi*, since these species were genotypically different in 9 base pairs (4.4%) by the COI sequences.

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. feroxis* is redescribed in the present study, documenting a new host, *T. sulphurescens*, and a new locality, the Itatiaia National Park, in addition to the type-host *M. ferox* in the Marambaia Island, southeastern Brazil.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento; and the Brazilian Navy, especially to the command of CADIM (Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia); that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). CNO-F has a scholarship from CNPq (Grant/Award Number: 120107/2018-0). JOM has a scholarship from CNPq/UFRRJ (Grant/Award Number: PIB875-2019). MSO has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in the article.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45200-1; 49605-1; 54951-1) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Berto, B. P., Luz, H. R., Flausino, W., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 74, 75–80.
- Berto, B. P., Flausino, W., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009b). *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher. *Mionectes rufiventris* in Brazil. *Acta Parasitologica*, 54, 301–304.
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W. L., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2013). Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In L. Ruiz & L. Iglesias (Eds.), *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease* (pp. 47–66). New York: Nova Science Publishers.
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 1–15.
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, 106, 707–713.
- Del Hoyo, J., & Collar, N. J. (2016). *HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World, Volume 2: Passerines*. Cambridge: Lynx Edicions, Barcelona & BirdLife International, 1013 pp.
- Dolnik, O. V., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2009). Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174.
- Duszynski, D. W. (1971). Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *Journal of Parasitology*, 57, 948–952.
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336.
- Fayer, R. (1980). Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, 6, 75–103.
- ICMBIO. (2016). Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 13 may 2020.
- Piacentini, V. Q., Aleixo, A., Agne, C. E., Maurício, G. N., Pacheco, J. F., Bravo, G. A., et al. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do

- Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23, 90–298.
- Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. do B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2015). A new species of *Isozona* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. *Zootaxa*, 4034, 193–196.
- Silva-Carvalho, L. M., Pastura, D. G. N., Gomes, J. V., Siqueira, P. B., Rodrigues, M. B., Lima, V. M., et al. (2018). *Isozona lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 95, 455–463.
- Stotz, D. F., Fitzpatrick, J. W., Parker, T. A., III, & Moskovits, D. K. (1996). *Neotropical Birds: Ecology and Conservation* (p. 478). Chicago: Universidade de Chicago Press.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Tenter, A. M., Barta, J. R., Beveridge, I., Duszynski, D. W., Mehlhorn, H., Morrison, D. A., et al. (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidian. *International Journal for Parasitology*, 32, 595–616.
- Tundisi, J. G., & Matsumura-Tundisi, T. (2008). Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 913–915.
- Williams, R. B., Thebo, P., Marshall, R. N., & Marshall, J. A. (2010). Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, 76, 69–76.
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., & Ryan, U. (2015). *Isozona serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66.
- Yang, R., Brice, B., Liu, Q., Berto, B. P., Austen, J., & Ryan, U. (2021). Morphological and genetic characterization of the first *Isozona* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). *Parasitology Research*, 120, 1037–1047.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Distribution, redescription, and molecular identification of *Isoospora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America

Mariana S. Oliveira¹ · Ericson R. de Mello² · Sergian V. Cardozo³ · Águida A. Oliveira⁴ · Viviane M. Lima⁴ · Ildemar Ferreira⁴ · Bruno P. Berto⁴

Received: 12 February 2021 / Accepted: 24 March 2021 / Published online: 2 April 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Woodcreepers are passerines of the family Dendrocolaptidae, which have a high forest dependency. The current work aimed to redescribe *Isoospora striata* McQuiston et al. 1997, from two new hosts in protected areas in Brazil, revealing new localities of parasitism, in addition to providing preliminary genotypic identifications via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene from both host species. *Isoospora striata* has oocysts that are subspheroidal to ovoidal, 19.4 × 16.8 μm with smooth wall. Oocyst residuum is absent, but micropyle and polar granules are present. Sporocysts are ovoidal, 13.6 × 8.3 μm, with both Stieda and sub-Stieda bodies. Sporocyst residuum is present and sporozoites with refractile body, nucleus, and striations. The morphological study and the 100% similarity in sequencing of the COI gene between samples of different dendrocolaptid species confirmed the identification of a single species, supporting the identification of *I. striata* in the Brazilian Atlantic forest and consequently the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical Region.

Keywords Taxonomy · Morphology · Sequencing · Coccidia · Oocysts · Passeriformes · Parque Nacional de Itatiaia · Parque Nacional da Serra dos Órgãos · Brazil

Introduction

Woodcreepers are passerines of the family Dendrocolaptidae, which brings together 52 species distributed predominantly in

forest environments in the Neotropical Region (Marantz et al. 2003). Dependence on forest environments causes dendrocolaptid species to suffer population decline and even local extinction in altered forests and forest fragments (Marantz et al. 2003; IUCN 2020). In the Atlantic Forest of the Southeast and South of Brazil, several studies confirm this vulnerability of the woodcreepers to anthropogenic changes, notably forest fragmentation (Aleixo and Vielliard 1995; Christiansen and Pitter 1997; Bornschein and Reinert 2000).

These birds feed predominantly on large insects, small vertebrates, snails, and bird eggs that nest in tree cavities. They also regularly follow mixed flocks and army ants, foraging in all strata as dominant species (Sick 1997; Piacentini et al. 2015). This predominantly insectivorous feeding habit potentially reduces these birds the fecal-oral transmission of parasites, unlike frugivorous birds (Dolnik et al. 2010). Among the various parasites in this context, the coccidian protozoans can be highlighted due to its great importance for biodiversity and conservation of birds.

To date, six coccidian species are recorded from Neotropical woodcreepers, but none of them in Brazil. In this sense, the current work aimed to redescribe *Isoospora striata* McQuiston et al. 1997, from two new hosts in protected areas in Brazil,

Section Editor: Nawal Hijjawi

✉ Bruno P. Berto
berto.ufrj@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brazil

⁴ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

revealing new localities and the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical Region. Additionally, the present study will provide preliminary genotypic identifications via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene from both host species.

Materials and methods

Sample collection

Eight expeditions were conducted in two Brazilian federal conservation units in Southeastern Brazil: (1) Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo (ICMBIO 2020a); and (2) Serra dos Órgãos National Park, another protected area created for biodiversity conservation of the Serra do Mar in the mountainous region of the State of Rio de Janeiro (ICMBIO 2020b). The first six expeditions were conducted on March (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) and April (22°27'52.0"S, 44°36'26.0"W) 2015, October (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) 2016, April (22°27'20.6"S, 44°36'28.6"W) 2017, and May (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) and August (22°26'57.0"S, 44°36'25.0"W) 2018 in the Itatiaia National Park, and the last two expeditions were conducted on February (22°27'23.8"S, 42°59'58.7"W) and August (22°27'29.0"S, 43°00'08.8"W) 2019 in the Serra dos Órgãos National Park. Mist nets were used for the capture of the birds. Sixteen plain-winged woodcreepers *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) in the Itatiaia National Park and two white-throated woodcreepers *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) in the Serra dos Órgãos National Park were captured. The captured birds were specifically identified (Sigrist 2014) and photographed. Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of feces from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution.

Morphological analyses

Samples were transported to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated in the centrifuge tubes and regularly oxygenated by shaking, at room temperature (~25 °C) for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014a). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope

(Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analyses

Individual oocysts identified with the same characteristic features under light microscopy were isolated, resuspended in PBS, and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al. 2009). DNA was extracted from the oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) (1×), 0.25 µL of each primer (0.2 µM), 3 µL of DNA (for primary reaction) or 3 µL of primary PCR product (for the secondary reaction), and 9 µL of nuclease-free water. Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses

All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, using an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared to each other and with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for coccidian species at the COI sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura et al. 2007). The evolutionary history was inferred using the neighbor joining (NJ)

and maximum likelihood (ML) methods, and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying neighbor joining and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood approach and then selecting the topology with superior log likelihood value. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

Prevalence and identification

Sixteen *D. turdina* from the Itatiaia National Park were examined, and 9 were positive for coccidian oocysts. The two *X. albicollis* captured in the Serra dos Órgãos National Park were also positive. These oocysts from both host species, after sporulation, were morphologically identified as *I. striata*. This material is described below.

- *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Figs. 1 and 2a–j)
- Kingdom: Chromista Cavalier-Smith, 1981
- Phylum: Miozoa Cavalier-Smith, 1987
- Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970
- Class: Coccidiomorpha Doflein, 1901
- Subclass: Coccidia Leuckart, 1879
- Family: Eimeriidae Minchin, 1903
- Genus: *Isospora* Schneider, 1881

Oocyst ($n = 88$) subspheroidal to ovoidal, $16\text{--}23 \times 13\text{--}21$ (19.4×16.8); length/width (L/W) ratio 1.0–1.4 (1.16). Wall bi-layered, 1.1–1.5 (1.3) thick, outer layer smooth, $c.2/3$ of total thickness. Micropyle delicate or inconspicuous, 2.8–7.1 (4.2) wide. Oocyst residuum is absent, but 1–3 polar granules are present. Sporocyst ovoidal, $11\text{--}16 \times 6\text{--}10$ (13.6×8.3); L/W ratio 1.5–2.0 (1.64). Stieda body is present, protruding, rounded to knob-like, 1.1–2.1 high \times 1.2–1.6 wide (1.3×1.4). Sub-Stieda body is present, rectangular to rounded, and lying directly beneath the Stieda body, 1.0–1.4 high \times 1.4–2.2 wide (1.2×1.9). Para-Stieda body is absent. Sporocyst residuum is present, consisting of granules partially bound and/or diffused. Sporozoites vermiform, with posterior refractile body, central nucleus, and striations.

Taxonomic summary

Hosts: *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Sittasominae),

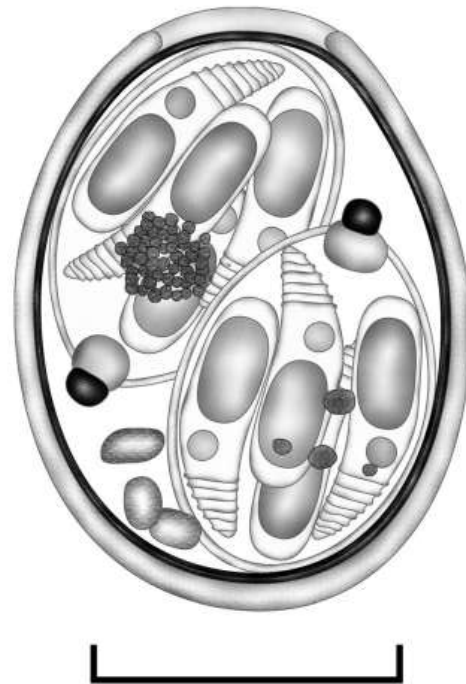


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oocyst for redescription of *Isospora striata* from woodcreepers in the Brazilian Atlantic forest. Scale bar: 10 μm

plain-winged woodcreeper; *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Dendrocolaptinae), white-throated woodcreeper.

Localities: Itatiaia National Park ($22^{\circ}27'S$, $44^{\circ}35'W$) and Serra dos Órgãos National Park ($22^{\circ}27'S$, $43^{\circ}00'W$), both from Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs, line drawing, and oocysts in 2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution (Williams et al. 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession numbers MZURPTZ2020026 (*D. turdina*) and MZURPTZ2020027 (*X. albicollis*). Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository numbers 110/2020 (*D. turdina*) and 111/2020 (*X. albicollis*). Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COI gene showed clear bands around ~ 250 bp. Representative sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers MW582619 (*D. turdina*) and MW582620 (*X. albicollis*).

Site of infection: Unknown.

Prevalence: 61% (11/18) in total; 56% (9/16) for *D. turdina*; and 100% (2/2) for *X. albicollis*.

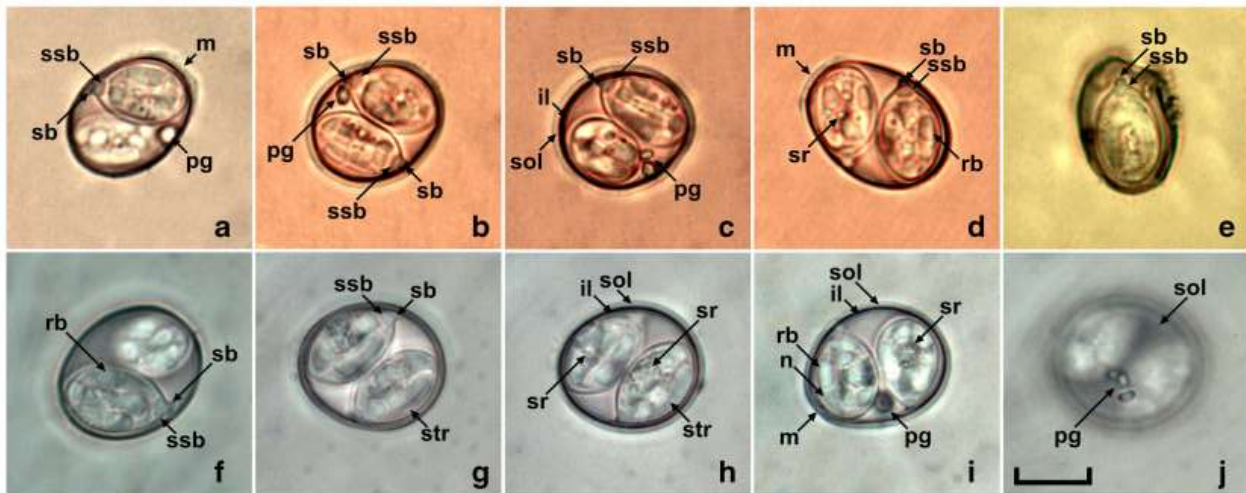


Fig. 2 Photomicrographs of *Isospora striata* recovered from plain-winged woodcreepers *Dendrocincla turdina* (a–e) and white-throated woodcreepers *Xiphocolaptes albicollis* (f–j). Note the inner (il) and the smooth outer (sol) layer of the oocyst wall, micropyle (m), nucleus (n),

polar granules (pg), refractile body (rb), sporocyst residuum (sr), Stieda body (sb), and sub-stieda (ssb) bodies and striations (str). Scale bar: 10 μ m

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis based on the COI gene included sequences from coccidians available in GenBank (Fig. 3). *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isospora striata* from *D. turdina* and *X. albicollis* were 100% identical and sat in a clade with the similarity of 99% with *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira, and Lopes, 2009, which is a parasite of tyrant-flycatchers

(Tyranni: Tyrannoidea) in Brazil (Ortúzar-Ferreira et al. 2021). *Isospora striata* was also close to other *Isospora* spp. of neotropical suboscine passerines (Tyranni), such as *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992, of antbirds (Thamnophilidae) with 96% similarity (Silva-Carvalho et al. 2018) but also with neotropical oscine passerines (Passeri), such as *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira and Lopes, 2014, of thrushes (Turdidae) with 97% similarity (Genovez-Oliveira et al. 2020), in addition to

Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI gene sequences of *Isospora* species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for neighbor joining (NJ) and maximum likelihood (ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

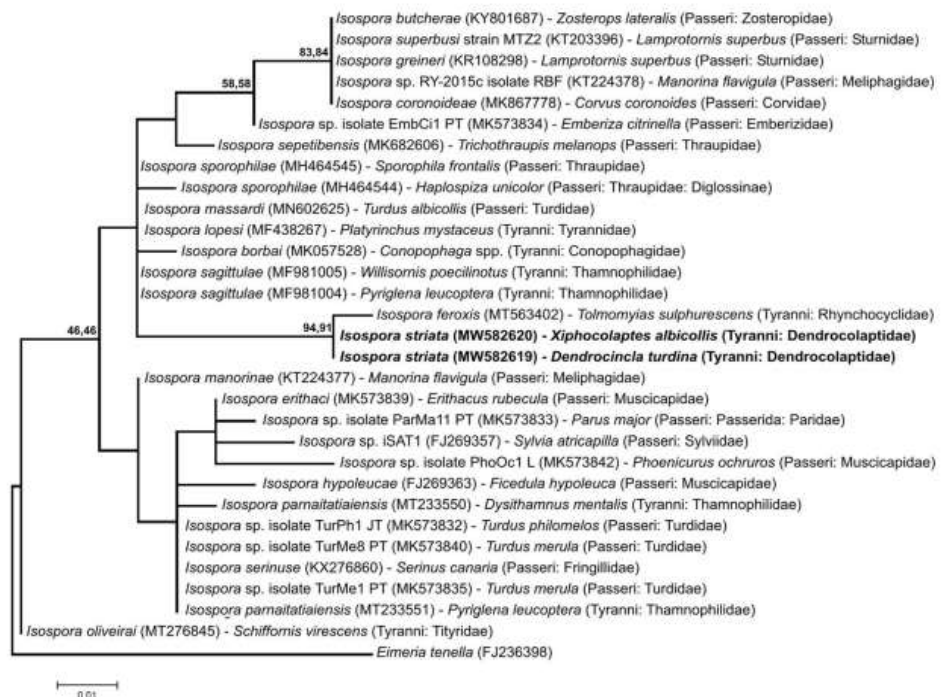


Table 1 Comparative morphology of *Isoxopora* spp. recorded from woodcreepers (Dendrocolapidae)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts																	
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residium	Micropyyle											
<i>Isoxopora concentrica</i> McQuiston and Caparella, 1995	<i>Dendrocolaptes certhia</i> (Boddaert, 1783)	South America,	McQuiston and Caparella (1995)	Ovoid	24–30 (26.9)	21–25 (22.7)	1.04–1.38	Smooth	Absent	Absent											
		Equador																			
		South America,	McQuiston and Caparella (1995)	Ovoid	26.0–31.0 (29.7)	23.0–26.0 (24.9)	1.08–1.30 (1.20)	Smooth	Absent	Absent											
<i>Isoxopora magna</i> McQuiston and Caparella, 1995	<i>Xiphorhynchus ocellatus</i> (Spix, 1824)	Equador	McQuiston et al. (1997)	Ovoid	18–21 (20.0)	15–19 (17)	1–1.3 (1.2)	Smooth	Absent	Absent											
		South America,																			
		Equador	McQuiston et al. (1997)	Ovoid	16–20 (18)	15–17 (16)	1.1–1.2 (1.2)	Smooth	Absent	Absent											
<i>Isoxopora striata</i> Walden and Caparella, 1997	<i>X. ocellatus</i> (Spix, 1824)	South America,	Current work	Subspheroidal to ovoid	16–23 (19.4)	13–21 (16.8)	1.0–1.4 (1.2)	Smooth	Absent	Present, inconspicuous											
		Equador																			
		South America,																			
<i>Isoxopora ubique</i> McQuiston and Caparella, 1997	<i>Glyphorhynchus spirurus</i> (Vieillot, 1819)	South America,	McQuiston and Caparella (1997)	Subspherical	21–27 (23.4)	19–24 (21.8)	1.00–1.23 (1.07)	Smooth	Absent	Absent											
		Equador																			
		South America,	McQuiston et al. (2010)	Subspherical to ovoid	15–23	14.5–19	1.1–1.3 (1.2)	Smooth	Absent	Absent											
<i>Isoxopora dendrocinclae</i> McQuiston, Galewsky and Caparella, 2010	<i>Dendrocincla turdina</i> (Lichtenstein, 1820)	South America,	McQuiston et al. (2010)	Subspherical to ovoid	15–23	14.5–19	1.1–1.3 (1.2)	Smooth	Absent	Absent											
		Equador																			
		South America,																			
Coccidia	Oocysts	Sporocysts		Sporozoites																	
		Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium	Refractile body	Nucleus	Striations									
<i>Isoxopora concentrica</i> McQuiston and Caparella, 1995	Present	Ovoid to ellipsoidal	15.0–18.0 (17.2)	9.0–12.0 (11.0)	1.42–1.70 (1.56)	Block-shaped	Ovoidal or bubble-shaped	Present, compact	Present, 1 posterior	Present	Present										
												Subspherical to ovoid	15.0–20.0 (15.8)	11.0–14.0 (12.6)	1.07–1.82 (1.28)	Broad, dome-like	Inconspicuous	Composed of uniform	Present, 2	Present	Absent
Spherical	Ovoidal	11–12 (11)	7–8 (8)	1.4–1.5 (1.4)	Protruding and nipple-like	Rectangular	Compact, spherical	Present, 1 posterior	Present	Present											
											Ovoidal	Ovoidal	11–16 (13.6)	6–10 (8.3)	1.5–2.0 (1.6)						

Table 1 (continued)

	Subspherical to ellipsoidal, 1–3	Ovoid	Ovoidal	14–16 (14.8)	9–11 (10.1)	1.36–1.67 (1.46)	Nipple-like	Absent	Rectangular to rounded	Composed	Present, 1 posterior	Present, 1 posterior	Absent
Walden and Caparella, 1997													
<i>Isospora ubique</i> McQuiston and Caparella, 1997													
<i>Isospora dendrocinclae</i> McQuiston, Galewsky and Caparella, 2010	Subspherical	Ovoid	Ovoid	12–14	7–10	1.6–1.8 (1.7)	Small and knob-like	Slightly larger and subglobular	Subspherical	Present, 1 posterior	Present, 1 posterior	Present	Absent

other *Isospora* spp. from other distant zoogeographic regions, such as *Isospora coronoideae* Liu et al. 2019, from Australian ravens *Corvus coronooides* Vigors and Horsfield, 1827 (Passeri: Corvidae) from Australia with 95% similarity (Liu et al. 2019).

Discussion

In Brazil, Passeriformes brings together 37 families distributed in all Brazilian biomes (Atlantic Forest, Amazon, Pantanal, Caatinga, Cerrado, and Pampa), comprising more than half of all birds. Dencrocolaptidae comprises 14 genera and 43 species known as “arapaçus” in Brazil (Piacentini et al. 2015). Despite this great diversity, the current work reports for the first time an *Isospora* sp. from Brazilian woodcreepers. The low density and prevalence expected from insectivorous birds (Dolnik et al. 2010) could justify this first report in Brazilian woodcreepers only in 2020; however, contrary to what was expected, the prevalence was reasonably high in the current study (61%), even with the low number of woodcreepers analyzed.

Isospora striata was originally described from ocellated woodcreepers *Xiphorhynchus ocellatus* (Spix, 1824) in the province of Morona-Santiago, about 5 km southwest of Taisha, in Ecuador (McQuiston et al. 1997). The oocysts identified in the current study were morphologically compatible with this original description by McQuiston et al. (1997); with the exception of the presence of the micropyle and other minor differences in size and shape of some characteristic features (Table 1). The micropyle identified in the oocysts of the current work is delicate and inconspicuous, being difficult to observe in most oocysts; therefore, it must have been unobserved by McQuiston et al. (1997). The differences in the morphometry might be justified by the greater number of oocysts measured in the current study, in addition to the greater number of host species and specimens (Sampaio 2002; Berto and Lopes 2020). The morphometric comparison between the oocysts of the two hosts of the current work was suppressed, due to the low number of oocysts and hosts *X. albicollis* in relation to *D. turdina*, which would weaken any statistical analysis. In any case, the morphometric differences between current and original work of McQuiston et al. (1997) were mainly associated with the measured ranges, while the means were closer. In fact, the main characteristic features that guided the identification as *I. striata* in the current work were the striations in the sporozoites and the rectangular sub-Stieda body, which were exceptionally highlighted by McQuiston et al. (1997) for being the main distinctive features of *I. striata* in comparison to the other *Isospora* spp. recorded from Dencrocolaptidae (Table 1).

The hosts of the current study, *D. turdina* and *X. albicollis*, and the host of the original description of *I. striata*,

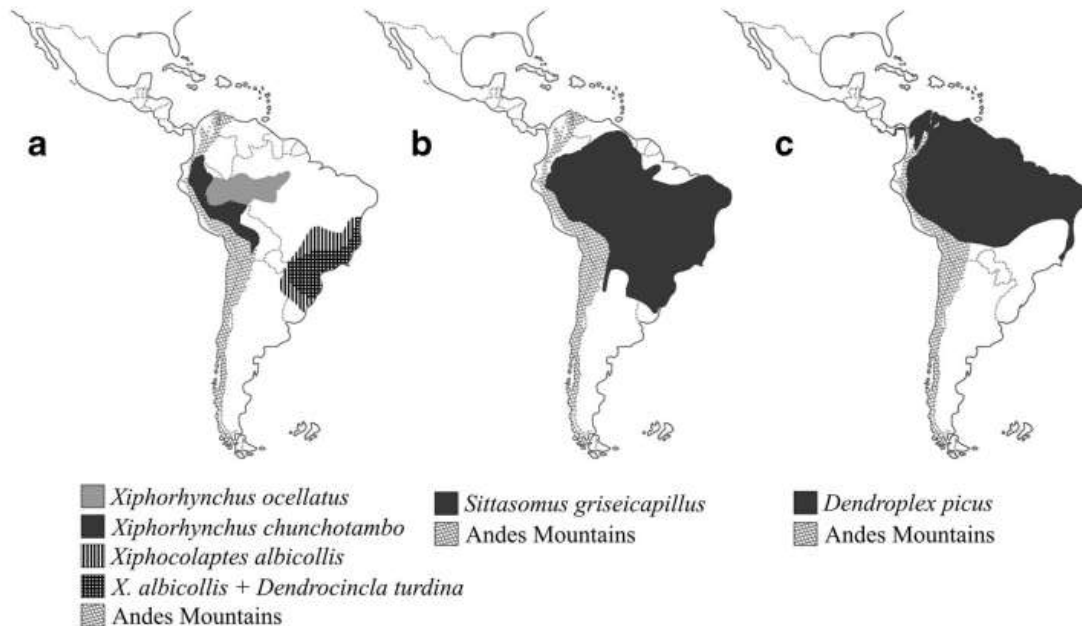


Fig. 4 Geographic range of the dendrocolaptid hosts of *Isospora striata* in the Neotropical Region [based on data from IUCN 2020]. *Xiphorhynchus chunchotambo* and *Xiphorhynchus ocellatus* are distributed in the Amazon. The news hosts *Xiphocolaptes albicollis* and *Dendrocincla turdina* have geographic ranges in the Atlantic Forest in

southeastern Brazil (a). *Sittasomus griseicapillus* (b) and *Dendroplex picus* (c) are examples of woodcreepers with wide Neotropical geographic ranges that are sympatric with *X. chunchotambo*, *X. ocellatus*, *X. albicollis*, and *D. turdina*

X. ocellatus, are not sympatric. In fact, the original host identified by McQuistion et al. (1997) is potentially the current Tschudi's woodcreeper *Xiphorhynchus chunchotambo* (von Tschudi, 1844), which was previously classified as a subspecies of *X. ocellatus*. Nevertheless, currently, only *X. chunchotambo* has distribution in Ecuador, while *X. ocellatus* is restricted to the Brazilian and Peruvian Amazon, being slightly sympatric with *X. chunchotambo* in the Brazilian States of Acre and Rondônia (Fig. 4). At the opposite end in South America, *D. turdina* and *X. albicollis* are distributed strictly in the Atlantic Forest.

Thus, the non-sympatry of these hosts could be incompatible with the identification of *I. striata* in the current study, since the transmission of *Isospora* spp. is fecal-oral and, therefore, depends on the minimum sympatry for there to be transmission/dispersion of its oocysts; however, as assumed in the studies by Berto et al. (2014b), Silva et al. (2017), and Silva-Carvalho et al. (2018), susceptible hosts with wide geographic distributions in South America could transmit *I. striata* to a wide range of sympatric susceptible hosts. In this way, the eastern olivaceous woodcreeper *Sittasomus griseicapillus* (Vieillot, 1818) and straight-billed woodcreeper *Dendroplex picus* (Gmelin, 1788) can be potential transmitters/dispersers of *I. striata* in South America, since they have wide geographical distributions and are sympatric with *X. ocellatus*/*X. chunchotambo*, *D. turdina*, and *X. albicollis* (Fig. 4). It is worth mentioning that this

assumption is based on the concept of specificity at the host family level, which has been widely accepted in the numerous studies of coccidian taxonomy (Duszynski and Wilber 1997; Berto et al. 2011).

The genotypic similarity of 100% at the COI gene between the samples of *D. turdina* and *X. albicollis* confirms the identification of a single species of these hosts and reinforces the identification of *I. striata* in the Brazilian Atlantic forest, because if this species can parasitize woodcreepers of different species, potentially this species must be widely distributed within the geographic ranges of neotropical woodcreepers (Fig. 4) (Berto and Lopes 2020).

The phylogenetic analysis of Fig. 3 does not allow further conclusions about the origin or aspects of monophyletic groups, since *Isospora* spp. from passerines of different families and suborders, from different and distant zoogeographic regions and with different characteristics sat in the same clades. Indeed, the use of a single gene for genotypic identification of *Isospora* spp. does not allow a more detailed phylogenetic characterization (Yang et al. 2021); in any case, the COI gene has been the most indicated for species confirmation (Ogedengbe et al. 2011, Yang et al. 2015, Silva-Carvalho et al. 2018) and the most used for genotypic and phylogenetic studies of *Isospora* spp., possibly due to the favorable extraction and amplification of mitochondrial genes, which are in a greater number of copies, from individual oocysts (Dolnik et al. 2009).

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. striata* is redescribed in the current work, documenting two new hosts, *D. turdina* and *X. albicollis*, and new localities in the Brazilian Atlantic forest, the Itatiaia National Park and the Serra dos Órgãos National Park.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento, and the Parque Nacional da Serra dos Órgãos, mainly to the research coordinator Dr Jorge Nascimento (Julião), who allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). MSO has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303 899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Declarations

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45200; 49605; 54951; 61126) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). All applicable institutional, national, and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Aleixo A, Vieliard J (1995) Composição e dinâmica da avifauna da mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool* 12: 493–511
- Berto BP, Lopes CWG (2020) Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. *J Parasitol* 106:707–713
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, CWG L (2011) Coccidia of new world passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 80:159–204
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014a) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1–15
- Berto BP, Lopes BB, Melinski RD, Souza A, Ribas C, Abreu F, Ferreira I, Lopes CWG (2014b) Coccidial dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isoospora sagittulae* McQuistion and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts. *Can J Zool* 92:383–388
- Bornschein MR, Reinert BL (2000) Aves de três remanescentes florestais do norte do Estado do Paraná. *Rev Bras Zool* 17:615–636
- Christiansen B, Pitter E (1997) Species loss in a forest bird community near Lagoa Santa in southeastern Brazil. *Biol Conserv* 80:23–32
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174
- Dolnik OV, Dolnik VR, Bairlein F (2010) The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98:97–103
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *J Parasitol* 83:333–336
- Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Morphological and molecular identification of *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitol Int* 75:102040
- ICMBIO (2020a) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/pamaitatiaia>>. Accessed 02 Jul 2020
- ICMBIO (2020b) Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/pamaserradosorgaos>>. Accessed 02 Jul 2020
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 02 Aug 2020
- Liu D, Brice B, Elliot A, Ryan U, Yang R (2019) *Isoospora coronoidae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Australian raven (*Corvus coronoides*) (Passeriformes: Corvidae) (Linnaeus, 1758) in Western Australia. *Parasitol Res* 118:2399–2408
- Marantz CA, Aleixo A, Bevier LR, Patten MA (2003) In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (eds) Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). Handbook of the birds of the world. Lynx Edicions, Barcelona, pp 358–447
- McQuistion TE, Capparella A (1995) Two new isosporan parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from the South American woodcreeper *Dendrocolaptes certhia*. *Acta Protozool* 34:299–302
- McQuistion TE, Capparella A (1997) *Isoospora ubique*: a new coccidian parasite from the wedge-billed woodcreeper (*Glyphorhynchus spirurus*) from South America. *Acta Protozool* 36:75–78
- McQuistion TE, Walden KKO, Capparella AP (1997) Two new species of *Isoospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the ocellated woodcreeper, *Xiphorhynchus ocellatus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae). *Arch Protistenkd* 147:401–404
- McQuistion TE, Galewsky S, Capparella AP, Rebling F (2010) *Isoospora dendrocinclae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the whitechinned woodcreeper (*Dendrocincla merula*) from South America. *Acta Protozool* 49:121–124
- Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *Int J Parasitol* 41: 843–850
- Ortúzar-Ferreira CN, Mello ER, Melo JO, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2021) Redescription and molecular identification of *Isoospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Syst Parasitol* [in press]
- Piacentini VDO, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, Bravo GA, Brito GRR, Naka LN, Olmos F, Posso S, Silveira LF, Betini GS, Carrano E, Franz I, Lees AC, Lima LM, Pioli D, Schunck F, Amaral FR, Bencke GA, Cohn-Haft M, LFA F, Straube FC, Cesari E (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Rev Brasil Ornitol* 23:91–298
- Sampaio IBM (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte, FEP MVZ Editora, 265pp
- Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp
- Sigrist T (2014) Guia de Campo: Avifauna Brasileira. São Paulo, Avis Brasilis, 608 pp
- Silva LM, Rodrigues MB, Pinho IF, Lopes BB, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG, Berto BP (2017) Some remarks on the distribution and dispersion of coccidia from icterid birds in South America: *Isoospora guaxi* n. sp. and *Isoospora bellicosus* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique *Cacicus*

- haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae) in Southeastern Brazil. *Syst Parasitol* 94:151–157
- Silva-Carvalho LM, Pastura DG, Rodrigues MB, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Genovez-Oliveira JL, Soares SS, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2018) *Isoospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitol Res* 117:2635–2641
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst Parasitol* 76:69–76
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59–66
- Yang R, Brice B, Liu Q, Berto BP, Austen J, Ryan U (2021) Morphological and genetic characterization of the first *Isoospora* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). *Parasitol Res* 120:1037–1047

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Isospora leptopogoni n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sepia-capped flycatcher *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 (Passeriformes: Rhynchocyclidae) in South America

Jennifer Oliveira Melo · Lucas de Assis Silva Andrade · Carla Maronezi · Ericson Ramos de Mello · Mariana de Souza Oliveira · Sergian Vianna Cardozo · Heider Alves Franco · Águida Aparecida de Oliveira · Viviane Moreira de Lima · Bruno Pereira Berto

Received: 18 February 2022 / Accepted: 11 April 2022 / Published online: 14 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract Coccidian protozoan species recorded from flycatchers are few, but they have been described with a certain frequency in recent years. In this context, the present study describes a new *Isospora* sp. from sepia-capped flycatchers *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846 captured in the Itatiaia National Park and in a reforestation area which is about 60 km away from the park boundaries, in addition to providing a molecular identification via

sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene. *Isospora leptopogoni* n. sp. has oöcysts that are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 22.0 × 19.7 µm, with a smooth, bi-layered wall, c.1.7 µm thick. The micropyle is delicate or inconspicuous. Oöcyst residuum is absent, but one to three polar granules are present. Sporocysts are lemon-shaped, measuring on average 14.7 × 9.3 µm, with a knob-like Stieda body and a rectangular to rounded

J. O. Melo
Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

L. A. S. Andrade · M. S. Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

C. Maronezi
Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

E. R. de Mello
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

S. V. Cardozo
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, Rio de Janeiro 25071-202, Brazil

H. A. Franco
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Pinheiral, Rua José Breves 550, Pinheiral, Rio de Janeiro 27197-000, Brazil

Á. A. de Oliveira
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

V. M. de Lima · B. P. Berto (✉)
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil
e-mail: bertobp@ufrj.br

sub-Stieda body. Sporocyst residuum is present, consisting of compactly bounded granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies and nucleus. *Isospora leptopogoni* is different from other *Isospora* spp. mainly due to its lemon-shaped sporocysts, the presence of micropyle and details of Stieda and sub-Stieda bodies. Phylogenetic analysis placed *I. leptopogoni* close to other *Isospora* spp. recorded from phylogenetically related hosts and from the same biogeographic region. Finally, the recurrent finding of this coccidian species in the same *L. amaurocephalus* specimen in a specific locality in the Itatiaia National Park suggests that the dispersion of *I. leptopogoni* needs continuous transmissions between susceptible passerines as the area of movement of each *L. amaurocephalus* specimen appears to be quite small.

Introduction

Parvorder Tyrannida comprises 320 species of passerines distributed in 10 different families in Brazil: Pipridae, Cotingidae, Tityridae, Oxyruncidae, Onychorhynchidae, Pipritidae, Platyrinchidae, Tachuridae, Rhynchocyclidae and Tyrannidae (Pacheco et al., 2021). In addition to Brazil, the geographic distribution of this parvorder extends throughout the Americas, however, they are more predominant in the Neotropical Region (BirdLife International, 2022).

The sepia-capped flycatcher *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi is a rhynchocyclid passerine commonly named as ‘cabeçudo’ in Brazil (Pacheco et al., 2021). This species occurs in almost the entire Neotropical region, on both *cis*- and *trans*-Andean sides. In Brazil it is mainly observed in the Atlantic Forest biome, in the South and Southeast regions (BirdLife International, 2022). It lives alone or in pairs, perching on vines and thin branches in exposed areas of the inner part of the forest (Sick, 1997). Although it often lives far from the ground and is an insectivorous bird, therefore being less predisposed to enteroparasites of faecal-oral transmission (Dolnik et al., 2010), there is a report of enteroparasitism by coccidian protozoa (Lopes et al., 2013).

Coccidians comprise many genera and species of parasites of domestic and wild animals, causing morbidity and mortality mainly in conditions of imbalance between host and environment (Berto &

Lopes, 2020). From Tyrannida some coccidian species are recorded from the families Cotingidae, Tityridae, Platyrinchidae, Rhynchocyclidae and Tyrannidae. In this context, the present study provides a description and molecular identification of a new species of *Isospora* from sepia-capped flycatchers *L. amaurocephalus* captured in different localities in the Médio Paraíba region of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

Materials and methods

Sample collection

A total of nine expeditions were conducted in two different localities in the Médio Paraíba Region in the State of the Rio de Janeiro, Southeastern Brazil, which are about 60 km apart from each other: (1) Itatiaia National Park, a Brazilian federal conservation unit with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO, 2022); and (2) a reforestation area of 37 ha within the *campus* Pinheiral of the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ, which is identified as Espaço Ecológico Educativo – EEcoE (Educational Ecological Space), at the municipality of Pinheiral in the State of the Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. The first eight expeditions were conducted on November (22°26'57"S, 44°36'25"W) and December (22°27'20"S, 44°36'28"W) 2014, March (22°27'40"S, 44°35'32"W) and April (22°27'52"S, 44°36'26"W) 2015, October (22°27'40"S, 44°35'32"W) 2016, June (22°27'4"S, 44°36'51"W) and November (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2017, and August (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2018, in the Itatiaia National Park. The last expedition was conducted on January (22°31'37"S, 43°59'45"W) 2019 in the EEcoE/IFRJ. Mist nets were used for the capture of the birds. Eleven sepia-capped flycatchers *L. amaurocephalus* in the Itatiaia National Park and one in the EEcoE/IFRJ were captured. The birds were specifically identified (Ridgely et al., 2015), photographed and banded with numbered metal rings provided by the Brazilian bird-ringing agency (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE). Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until

defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of faeces (c.0.1 g) from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% ($K_2Cr_2O_7$) solution (Dolnik, 2006).

Morphological analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), where they were incubated in the centrifuge tubes, and regularly oxygenated by shaking, at room temperature ($\sim 25^\circ C$) for 7 days. Oöcysts were recovered by the Sheather's method and identified microscopically according Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a Eureka 5.0 digital camera (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications (Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT) from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 2020, Corel Corporation, Ontario, Canada). All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analyses

An individual oöcyst from each sample was isolated from serial dilutions of the oöcysts in drops on a microscope slide using a sterile micropipette. The isolated oöcyst was resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the oöcyst using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Four freeze-thaw cycles were applied prior to DNA extraction in order to achieve complete lysis of the oöcysts. PCR amplification of a partial fragment of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene (c.250 bp) was carried out using nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The nested PCR amplicons were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses

Nested PCR amplicons were sequenced using an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). The newly generated sequence was compared to those for *Isospora* spp. available in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The phylogenetic tree was constructed using the newly generated COI sequence aligned with *Isospora* spp. available on GenBank. Alignments, distance analyses and phylogenies were conducted using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>) in MEGA X (Kumar et al., 2018). Maximum likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) trees were constructed, and the distances computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA X. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

Nine of the eleven (84%) sepia-capped flycatchers *L. amaurocephalus* captured in the Itatiaia National Park were positive for coccidian oöcysts. The sepia-capped flycatcher captured in the EEcoE/IFRJ was also positive. These oöcysts have a distinct morphotype from those coccidian species recorded as parasites of Tyrannida. This material is described below.

Family Eimeriidae Minchin, 1903

Genus *Isospora* Schneider, 1881

Isospora leptopogoni Melo & Berto n. sp.

Type-host: *Leptopogon amaurocephalus* Tschudi (Passeriformes: Tyranni: Tyrannides: Tyrannida: Rhynchocyclidae: Pipromorphinae), sepia-capped flycatcher.

Type-locality: Parque Nacional do Itatiaia ($22^\circ 27' 20'' S$, $44^\circ 36' 28'' W$), southeastern Brazil.

Other locality: Espaço Ecológico Educativo ($22^\circ 31' 37'' S$, $43^\circ 59' 45'' W$), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, campus Pinheiral, southeastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oöcysts in 2.5% $K_2Cr_2O_7$ solution (Williams et al.,

2010) are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-127/2022. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown.

Prevalence: 84% (10 out of 12 birds examined).

Representative DNA sequence: One representative COI sequence was deposited in the GenBank database under the accession number OM568833.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in Article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 2012) details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) of the article is urn:lsid:zoobank.org:pub:3E3A9902-B7AE-407E-89AA-8A4624080B49. The LSID for the new name *Isospora leptopogoni* Melo & Berto n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:14DAD073-D779-4762-A92A-AB88F5D6D253.

Etymology: The specific name is derived from the genus name of the type-host.

Description (Figs. 1, 2A–F)

Oöcyst (n = 63) subspheroidal to ovoidal, 19–25 × 18–23 (22.0 × 19.7); length/width (L/W) ratio 1.0–1.3 (1.12). Wall bi-layered, 1.5–1.9 (1.7) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle delicate or inconspicuous, 2.3–5.0 (3.8) wide. Oöcyst residuum absent, but 1–3 polar granules are present. Sporocyst lemon-shaped, 12–17 × 8–11 (14.7 × 9.3); L/W ratio 1.3–1.8 (1.58). Stieda body present, knob-like, 0.9–1.3 high × 1.6–2.2 wide (1.1 × 1.8). Sub-Stieda body present, rectangular to rounded, 1.3–2.2 high × 1.4–2.8 wide (1.6 × 2.1). Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, consisting of compactly bounded granules. 4.1–7.3 × 3.7–6.8 (5.6 × 5.1). Sporozoites vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and a central nucleus.

Phylogenetic analysis

DNA amplification of the oöcysts of *I. leptopogoni* n. sp. showed a clear band of c.250 bp. Sequences of two individual oöcysts from two different samples/birds

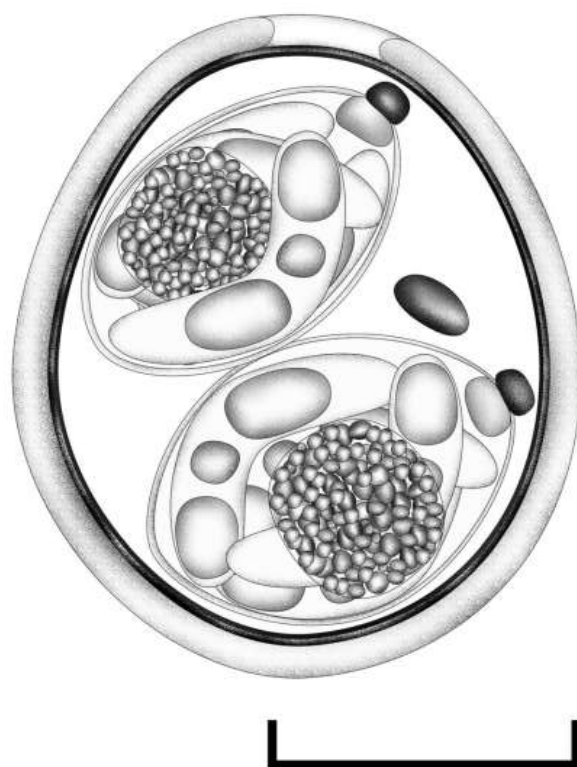


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oöcyst of *Isospora leptopogoni* from sepia-capped flycatchers in South America. Scale-bar: 10 µm.

were obtained and were 100% identical to each other. Phylogenetic analysis included 25 sequences for *Isospora* spp. available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. *Isospora leptopogoni* n. sp. was recovered within a small monophyletic group with *Isospora borbai* Silva-Carvalho & Berto, 2019, *Isospora lopesi* Silva-Carvalho & Berto, 2018 and *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992, which are also parasites of suboscines passerines (Tyranni) from the Neotropical Region (Silva-Carvalho et al., 2018a, 2018b, 2019). This group of these three coccidians from suboscines was included within a larger clade with *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014, *Isospora sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro & Lopes, 2005, *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008 and *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010, which are also parasites of passerines from the Neotropical Region, although these are oscines passerines

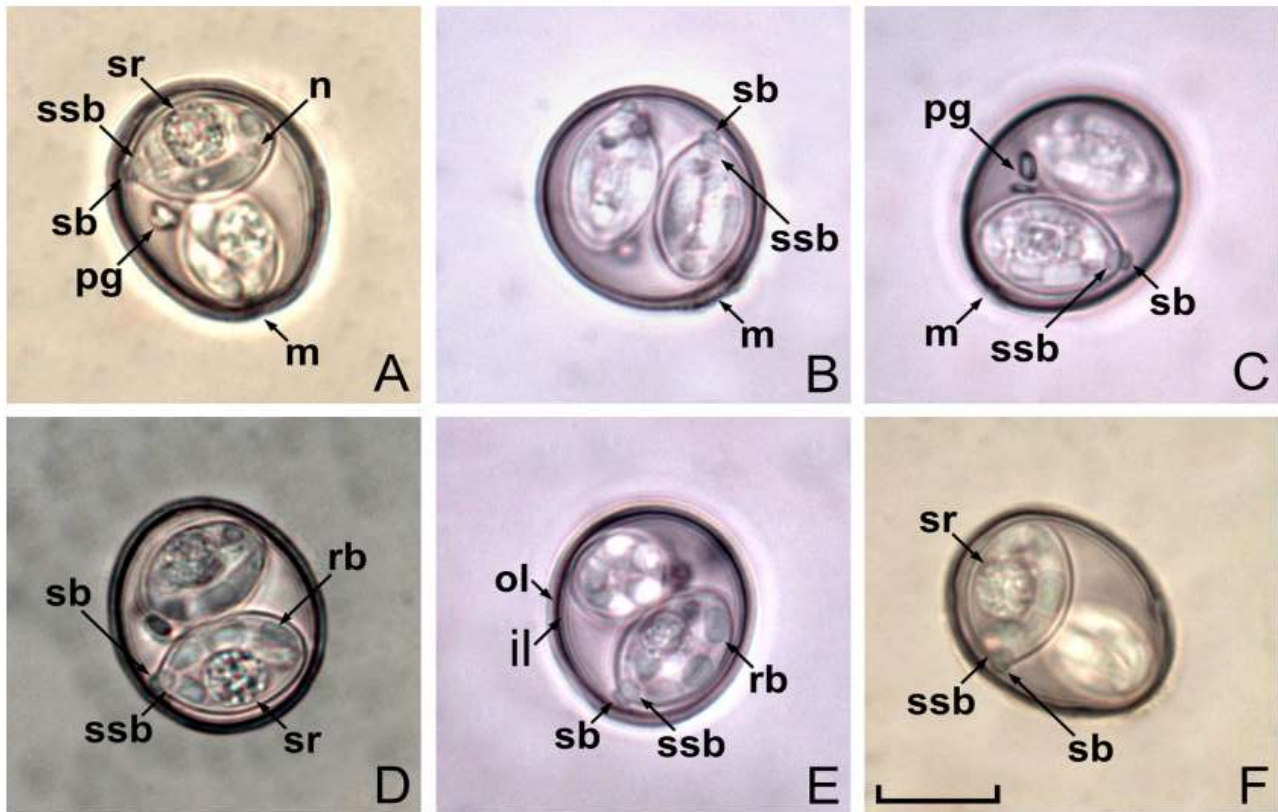


Fig. 2 Photomicrographs of *Isospora leptopogoni* recovered from sepiacapped flycatchers in South America. Note the inner (il) and the smooth outer (sol) layer of the oöcyst wall, micropyle (m), nucleous (n), polar granule (pg), refractile body (rb), sporocyst residuum (sr), and Stieda body (sb) and sub-stieda (ssb) bodies. Scale-bar: 10 µm.

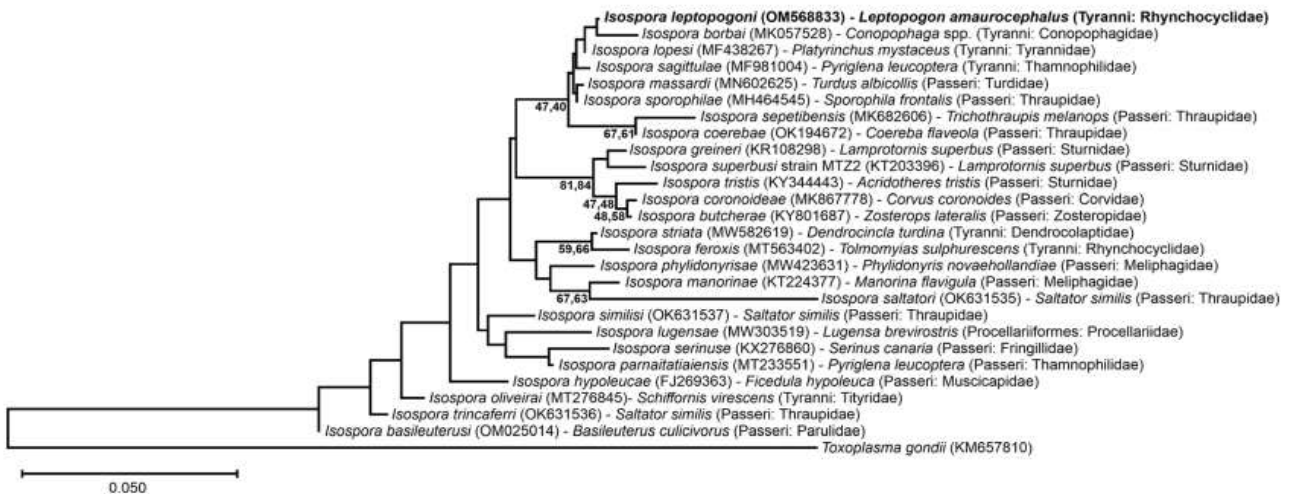


Fig. 3 Neighbor-Joining tree estimated from the COI gene sequences of *Isospora* species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 40%) for Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

(Rodrigues et al., 2019, Genovez-Oliveira et al., 2019, 2020). All these *Isospora* spp. had the highest similarity of 99% with *I. leptopogoni*.

Discussion

Since the taxonomic review of coccidia of New World passerine birds by Berto et al. (2011), which is based on the guidelines of Duszynski & Wilber (1997), reports and descriptions of passerine coccidia have been studied and recorded according to the passerine host family. However, there is currently an inconsistency in the taxonomy of Aves when comparing different bibliographic sources, even if updated. In this case, BirdLife International (2022) classifies *L. amaurocephalus* as Tyrannidae, while the Brazilian Ornithological Records Committee (Pacheco et al., 2021) considers several smaller families organized into parvorders, superfamilies and subfamilies, derived from the large traditional family Tyrannidae. Because the Brazilian Ornithological Records Committee is the main bibliographic source of taxonomy of Aves in Brazil and establishes more classification groups facilitating the delimitation of phylogenetically closer and distant passerine hosts, this Brazilian classification was based for this study.

From Rhynchocyclidae, which is the family of *L. amaurocephalus*, only two coccidian species are recorded; therefore, this study compared the oöcysts obtained from *L. amaurocephalus* with *Isospora* spp. recorded from passerines of parvorder Tyrannida. Of the ten families that Tyrannida brings together, only five have coccidian species recorded, as shown in Table 1. *Isospora leptopogoni* can be easily distinguished from the six *Isospora* spp. recorded from Tyrannida by the lemon-shaped sporocyst with knob-like Stieda and rectangular to rounded sub-Stieda. Furthermore, it is the only one of these *Isospora* spp. to have smooth oöcysts with a delicate or inconspicuous micropyle (Table 1).

A specimen of *L. amaurocephalus* captured in November 2017 on a trail named 'Trilha das Borboletas' (Trail of the Butterflies) (22°26'57"S, 44°36'25"W) in Itatiaia National Park, was recaptured nine months later, in August 2018, in the same locality. This sepia-capped flycatcher has been ringed with the number ring 'C114236' (CEMAVE). Both samples collected in 2017 and 2018 were positive for

I. leptopogoni, but with low densities of 81 and 74 oöcysts per faecal drop, respectively (Dolnik, 2006). This finding suggests that *L. amaurocephalus* specimens do not move over long distances individually, being probably restricted to small areas of movement. In this thought, the dispersion of *I. leptopogoni* must depend on frequent transmissions between *L. amaurocephalus* specimens, or other susceptible host species that are distributed in the Médio Paraíba Region where this study was developed, since the dispersion of coccidia by a single specimen would be quite restricted to small areas. It is also worth mentioning that the low densities and the absence of clinical signs observed in this specimen 'C114236', at different times, is compatible with the good state of conservation of the Itatiaia National Park (Berto & Lopes, 2020).

The primer used to amplify and sequence the genic region of ~250 bp of COI in this study has been considered unsuitable for phylogenetic studies, although it is being reasonably appropriate for the delimitation of *Isospora* spp. of passerines until then (Genovez-Oliveira et al., 2020; Maronezi et al., 2022; Mello et al., 2022). That is, despite some sequences of *Isospora* spp. from passerines being 100% identical to each other for this same genic region when analyzed by BLAST, *I. leptopogoni* was not 100% identical with any sequence deposited in GenBank. In the phylogenetic analysis (Fig. 3) the sequence of *I. leptopogoni* sat close to coccidian species from phylogenetically close passerines and from the same biogeographic region; although other *Isospora* spp. also from phylogenetically related passerines, such as *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009a, 2009b, were distant in the phylogenetic analysis. Despite these phylogenetic observations, the support values for the tree were very low, including for the placement of *I. leptopogoni*, making any interpretation of the topology with little meaning. Anyway, this ~250 bp sequence of *I. leptopogoni*, even if short and phylogenetically inconclusive, represents a minimal molecular identification for this species that separates it from other *Isospora* spp. from passerines until then deposited in GenBank; in addition, this sequence may be used in the future to complement the sequencing of other nearby genic regions in their mitochondrial genome.

Finally, the comparison of *I. leptopogoni* with *Isospora* spp. recorded from Tyrannida birds (Table 1),

Table 1 Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from Tyrannida birds.

Species	Host		Reference	Oocyst					
	Species	Family		Shape	Size (µm)	L/W ratio	Polar granule	Wall	Micropyle
<i>Isoospora arapongae</i>	Doležalová, Torres, Fernández & Modrý, 2004	Procnias nudicollis (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	sub-spheroidal to ellipsoidal	17–22 × 14–16 (19 × 15)	1.1–1.4 (1.3)	1–3	smooth	absent
<i>Isoospora ferroxis</i>	Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009a, 2009b	Myiarchus ferrox (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	sub-spheroidal	18–20 × 17–20 (19 × 18)	1.0–1.1 (1.1)	usually 2	low roughness	absent ¹
<i>M. ferrox</i>	(Tyrannidae: Tyranninae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	sub-spheroidal	21–23 × 20–23 (22 × 21)	1.0–1.1 (1.0)	1–3	(usually 2 bonded)	low to moderate roughness	present
<i>Toimomyias sulphurescens</i>	Spix (Rhynchocyclidae: Rhynchocyclinae)		18–23 × 18–22 (20 × 20)	1.0–1.1 (1.0)					
<i>Mionectes mionectesi</i>	Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2009a, 2009b	Mionectes rufiventris Cabanis (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	Berto et al. (2009b)	ellipsoidal	26–31 × 19–23 (28 × 21)	1.2–1.4 (1.3)	usually 1–2	smooth	absent
<i>Isoospora atilae</i>	Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015	Attila rufus (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)	Rodrigues et al. (2015)	sub-spheroidal to ellipsoidal	18–22 × 18–21 (20 × 19)	1.0–1.2 (1.1)	1–2	smooth	absent
<i>Isoospora lopesi</i>	Silva-Carvalho & Berto, 2018	Platyrinchus mystaceus Vieillot (Platyrinchidae)	Silva-Carvalho et al. (2018a, 2018b)	sub-spheroidal to ovoidal	18–24 × 18–22 (21 × 20)	1.0–1.2 (1.1)	1	smooth	absent
<i>Isoospora oliveirai</i>	Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020	Schiffornis virescens (Lafresnaye) (Tyridae: Schiffornithinae)	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	sub-spheroidal	24–28 × 23–27 (26 × 25)	1.0–1.1 (1.0)	1–6	slightly rough	absent
<i>Isoospora leptopogoni</i>	Melo & Berto n. sp.	Leptopogon amaurocephalus Tschudi (Rhynchocyclidae: Pipromorphinae)	present study	sub-spheroidal to ovoidal	19–25 × 18–23 (22 × 20)	1.0–1.3 (1.1)	1–3	smooth	present, delicate or inconspicuous

Table 1 continued

Species	Host	Reference	Sporocyst			Sporocyst residuum		
			Shape	Size (μm)	L/W ratio		Stieda body	Sub-Stieda body
<i>Isospora arapongae</i> Doležalová, Torres, Fernández & Modrý, 2004	<i>Procnias nudicollis</i> (Vieillot) (Cotingidae: Cotinginae)	Doležalová et al. (2004)	ellipsoidal slightly asymmetric	12–13 \times 7–9 (12 \times 8)	1.3–1.7 (1.5)	barely visible	absent	compact
<i>Isospora ferox</i> Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009a, 2009b	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae: Tyranninae)	Berto et al. (2009a)	ovoidal	11–13 \times 8–10 (12 \times 8)	1.0–1.5 (1.4)	flattened, (0.3 \times 1.2)	prominent, (1.2 \times 2.5)	diffuse
<i>M. ferox</i> (Tyrannidae: Tyranninae)		Ortúzar-Ferreira et al. (2021)	ovoidal to ellipsoidal	14–15 \times 9–10 (15 \times 10)	1.4–1.6 (1.5)	flattened to half-moon-shaped, 0.5–0.7 \times 1.3–2.2 (0.6 \times 1.7)	rounded to trapezoidal, 1.0–1.8 \times 2.4–3.3 (1.3 \times 2.9)	diffuse
<i>Tolmomyias sulphureus</i> Spix (Rhychoeyclidae: Rhychoeyclinae)				11–15 \times 8–10 (13 \times 9)	1.3–1.6 (1.5)			
<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis (Rhychoeyclidae: Pipromorphinae)		Berto et al. (2009b)	elongate-ellipsoidal	17–22 \times 10–13 (20 \times 12)	1.6–1.8 (1.7)	rounded, (0.8 \times 1.1)	prominent, (1.4 \times 2.1)	compact, subspherical
<i>Attila rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae: Tyranninae)		Rodrigues et al. (2015)	ellipsoidal	12–15 \times 7–9 (13 \times 8)	1.6–1.9 (1.7)	knob like, (1.0 \times 2.0)	rounded to trapezoidal, (2.5 \times 4.0)	diffuse
<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot (Platyrinchidae)		Silva-Carvalho et al. (2018a, 2018b)	ellipsoidal	12–16 \times 8–11 (15 \times 9)	1.5–1.9 (1.7)	flattened to half-moon-shaped, (1.0 \times 2.5)	rounded, (2.0 \times 2.5)	diffuse
<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye) (Tityridae: Schiffornithinae)		Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	lemon-shaped	10–11 \times 6–7 (10 \times 6)	1.6–1.7 (1.6)	knob-like to half-moon-shaped, (2.0 \times 3.5)	rounded, (2.5 \times 3.5)	diffuse
<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi (Rhychoeyclidae: Pipromorphinae)		present study	lemon-shaped	12–17 \times 8–11 (15 \times 9)	1.3–1.8 (1.6)	knob-like, (1.1 \times 1.8)	rectangular to rounded, (1.6 \times 2.1)	compact

¹The misidentification of the absence of micropyle was corrected for *E. ferox* in the later work by Ortúzar-Ferreira et al. (2021).

in addition to molecular identification by sequencing the COI gene, clearly supports the designation as a unique species. Therefore, *I. leptopogoni* is considered as new to science, being the third species described from Rhynchocyclidae and the seventh recorded in the parvorder Tyrannida.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinators Dr Léo Nascimento (previous) and Marcelo Souza Motta (current); and the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Pinheiral; that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). JOM has a scholarship from CNPq/UFRRJ (Grant/Award Number: PVBS2480-2021). LASA and CM have scholarships from CAPES (Grant/Award Number: 001). MSO has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). BPB has fellowships from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in the article.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45200; 49605; 54951; 70132), CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616) and CEUA/UNIGRANRIO (protocol 021/2019). Banding permits and metal rings were issued by CEMAVE/ICMBio (Senior Ringer: BPB, registration 5967850; Junior Ringer: MSO, registration 7035678). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Berto, B. P., Luz, H. R., Flausino, W., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009a). New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 74, 75–80. <https://doi.org/10.1007/s11230-009-9197-3>
- Berto, B. P., Flausino, W., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2009b). *Isoospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. *Acta Parasitologica*, 54, 301–304. <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0053-z>
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W. L., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 1–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, 106, 707–713. <https://doi.org/10.1645/19-148>
- BirdLife International. (2022). IUCN Red List for birds. <http://www.birdlife.org>. Accessed 26 Jan 2022.
- Dolezalová, M., Torres, J., Fernández, H., & Modrý, D. (2004). *Isoospora araponga* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of *Isoospora* Schneider from a bare-throated bellbird, *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Cotingidae) from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 829–830. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800008>
- Dolnik, O. (2006). The relative stability of chronic *Isoospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in black-caps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. *Parasitology Research*, 100, 155–160. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>
- Dolnik, O. V., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2009). Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Dolnik, O.V., Dolnik, V.R., & Bairlein, F. (2010). The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98, 97–103. <https://doi.org/10.5253/078.098.0112>
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
- Genovez-Oliveira, J.L., Cardozo, S.V., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., & Berto, B.P. (2019). Morphological and molecular identification of *Isoospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoniinae) in South America. *Acta Protozoologica*, 58, 17–23. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.19.007.10838>
- Genovez-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Thode-Filho, S., Cardozo, S.V., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., & Berto, B.P. (2020). Morphological and molecular identification of *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology International*, 75, 102040. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102040>

- ICMBIO. (2022). Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 26 Jan 2022.
- ICZN. (2012). International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bulletin of zoological nomenclature*, 69, 161–169. <https://doi.org/10.21805/bzn.v69i3.a8.161>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lopes, B.D., Berto, B.P., Ferreira, I., Luz, H.R., & Lopes, C.W.G. (2013). Coccidial distribution from passerines in an area of Atlantic Forest in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil. *Coccidia*, 1, 10–16.
- Maronezi, C., Oliveira, M.S., Genovez-Oliveira, J.L., Mello, E.R., Cepeda, P.B., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., & Berto, B.P. (2022). *Isospora* spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. *Systematic Parasitology*, 99, 285–297. <https://doi.org/10.1007/s11230-022-10025-9>
- Mello, E.R., Oliveira, M.S., Andrade, L.A.S., Cardozo, S.V., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., & Berto, B.P. (2022). *Isospora basileuterusi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 2, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2022.100079>
- Ortúzar-Ferreira, C.N., Genovez-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Mello, E.R., Thode-Filho, S., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., & Berto, B.P. (2020). *Isospora oliveirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. *Acta Parasitologica*, 65, 843–851. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00237-8>
- Ortúzar-Ferreira, C.N., Mello, E.R., Melo, J.O., Oliveira, M.S., Thode-Filho, S., Cardozo, S.V., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., Berto, B.P. (2021). Redescription and molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Systematic Parasitology*, 98, 333–341. <https://doi.org/10.1007/s11230-021-09981-5>
- Pacheco, J.F., Silveira, L.F., Aleixo, A., Agne, C.E., Bencke, G.A., Bravo, G.A., Brito, G.R.R., Cohn-Haft, M., Maurício, G.N., Naka, L.N., Olmos, F., Posso, S., Lees, A.C., Figueiredo, L.F.A., Carrano, E., Guedes, R.C., Cesari, E., Franz, I., Schunck, F., & Piacentini, V.Q. (2021). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. *Ornithology Research*, 29, 94–105. <https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>
- Ridgely, R.S., Gwynne, J.A., Tudor, G., & Argel, M. (2015). *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*. São Paulo: Horizonte, 417 pp.
- Rodrigues, M. B., Silva, L. M., Lopes, B. do B., Berto, B. P., Luz, H. R., Ferreira, I., & Lopes, C. W. G. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the grey-hooded attila *Attila rufus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Tyrannidae) on the Marambaia Island, Brazil. *Zootaxa*, 4034, 193–196. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4034.1.10>
- Rodrigues, M.B., Oliveira, J.L.G., Silva-Carvalho, L.M., Pastura, D.G.N., Gomes, J.V., Oliveira, M.S., Siqueira, P.B., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., Berto, B.P. (2019). The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro & Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, 96, 423–431. <https://doi.org/10.1007/s11230-019-09859-7>
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 pp.
- Silva-Carvalho, L. M., Pastura, D. G. N., Gomes, J. V., Siqueira, P. B., Rodrigues, M. B., Lima, V. M., & Berto, B. P. (2018a). *Isospora lopesi* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology*, 95, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s11230-018-9795-z>
- Silva-Carvalho, L.M., Pastura, D.G., Rodrigues, M.B., Gomes, J.V., Oliveira, M.S., Siqueira, P.B., Genovez-Oliveira, J.L., Soares, S.S., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I., Berto, B.P. (2018b). *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitology Research*, 117, 2635–2641. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5955-y>
- Silva-Carvalho, L.M., Genovez-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Rodrigues, M.B., Abreu, S.T., Ortúzar-Ferreira, C.N., Franco, H.A., Thode-Filho, S., Oliveira, Á.A., Lima, V.M., Ferreira, I., Berto, B.P. (2019). *Isospora borbai* n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from gnateaters *Conopophaga* spp. (Passeriformes: Tyranni: Conopophagidae) in South America. *Acta Parasitologica*, 64, 617–624. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00079-z>
- Williams, R. B., Thebo, P., Marshall, R. N., & Marshall, J.A. (2010). Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, 76, 69–76. <https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., & Ryan, U. (2015). *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Worldwide Dispersion of Coccidia from Migratory Birds: First Report of *Eimeria bazi* Chauhan et Bhatia, 1970 (Eimeriidae) Outside Asia from Buff-Necked Ibises *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) (Threskiornithidae) in South America

Rísia Brígida Gonçalves Cabral¹ · Carlos Nei Ortúzar-Ferreira² · Mariana de Souza Oliveira¹ · Ericson Ramos de Mello³ · Águida Aparecida de Oliveira⁴ · Viviane Moreira de Lima⁵ · Ildemar Ferreira⁵ · Bruno Pereira Berto⁵

Received: 10 March 2022 / Accepted: 15 June 2022 / Published online: 14 July 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2022

Abstract

Background *Eimeria* spp. are coccidian protozoan parasites of domestic and wild animals. Pelecaniform birds are hosts of some *Eimeria* spp., however, from the family Threskiornithidae only one eimerian species is recorded, *Eimeria bazi* Chauhan et Bhatia, 1970 which was described from red-naped ibises *Pseudibis papillosa* (Temminck, 1824) in India. In this study, in turn, this species is morphologically and molecularly identified from buff-necked ibises *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) in Brazil.

Purpose This study aimed to report *E. bazi* from buff-necked ibises *T. caudatus* in southeastern Brazil, revealing the worldwide distribution of this coccidian species, in addition to providing preliminary genotypic identification via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene.

Methods A total of 73 fecal samples were collected from a flock of buff-necked ibises, which remained on the campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro—UFRRJ) from March 2019 to August 2020. Fecal samples were processed by the Sheather's method to recover oocysts. The morphological and morphometrical studies of the oocysts were performed using an optical microscope and graphic editing software. Molecular analysis was performed by sequencing of the COI gene, and the phylogenetic analysis was based in the neighbor-joining and maximum likelihood estimates.

Results Forty-five fecal samples were positive for oocysts identified as *E. bazi*. This oocysts are ovoidal, $26.2 \times 18.9 \mu\text{m}$, with smooth to slightly rough wall, $c.1.7 \mu\text{m}$ thick. Micropyle robust and protruding, sometimes with a polar body attached. Oocyst residuum absent, but one or two small polar granules are present. Sporocysts ovoidal to lemon-shaped, $14.2 \times 8.7 \mu\text{m}$. The Stieda body is knob-like to rounded and sub-Stieda body is absent or vestigial. Sporocyst residuum is composed of granules often membrane-bound. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies. This morphology was consistent with the original description of *E. bazi* from *P. papillosa* in India. Molecular analysis at the COI gene exhibited low similarity with coccidians sequenced for the same genic region deposited in GenBank, sitting *E. bazi* separately on the cladogram.

Conclusions The morphological and molecular studies support the identification of *E. bazi* from *T. caudatus* in South America, thus revealing the wide distribution of this eimerian species in the world provided by migratory birds and/or with intercontinental distribution.

Keywords Morphology · Molecular biology · Taxonomy · Phylogeny · Coccidia · Oocysts · Migratory birds · Ibises · Federal Rural University of Rio de Janeiro

✉ Bruno Pereira Berto
bertobp@ufrj.br

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Coccidia are a highly diverse subclass of protozoan obligate intracellular parasites of domestic and wild animals [1, 2]. *Eimeria* Schneider, 1875 is the genus most predominant and diverse, being identified from mammals, birds, reptiles, amphibians and fish, in addition to invertebrates [3]. From birds, the most prevalent coccidian genera are *Isoospora* Schneider, 1881 and *Eimeria*; however, *Isoospora* spp. occur more frequently in passeriform birds, while *Eimeria* spp. are more frequent in non-passeriform birds [3].

The buff-necked ibis *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) is a non-passeriform bird of the order Pelecaniformes, family Threskiornithidae. This species is among the ibises with the widest geographic distribution in the Neotropical Region [4]. It is a bird typical of grasslands and occurs in a wide variety of open and semi-open habitats, such as grasslands and savannas, in addition to lawns on the shores of lakes, ponds and other watercourses [5]. It forages in flocks, but also occasionally solitary, in soft soils and grasslands. It feeds on small reptiles, amphibians and arthropods, mainly insects including their larvae, which are captured directly from the substrate and through the deep penetration of its long beak into the soil [6]. It is a mainly sedentary species with predominance of local movements; however, it has expanded its geographic distribution, especially in south-eastern Brazil [7, 8].

The habits of the buff-necked ibises living in flocks, foraging in contact with the ground and having a predominance of local movements, favor the biology of coccidian parasites [9]. In general, infected birds shed coccidian oocysts into the environment when defecating, which will become sporulated/viable depending on the conditions of humidity, temperature and atmospheric oxygen [2]. Then, the habits of the buff-necked ibises would ensure the continuity of the life cycle of its coccidians, since the presence of other susceptible ibises in the same environment would be constant [9].

Despite this favorable context for coccidiosis in buff-necked ibises, there are no descriptions of coccidian species parasitizing *T. caudatus*; however, there is one eimerian species recorded from Threskiornithidae, *Eimeria bazi* Chauhan et Bhatia, 1970 described from red-naped ibises *Pseudibis papillosa* (Temminck, 1824) in India [10]. Consequently, in this study, fecal samples were collected from a flock of buff-necked ibises *T. caudatus* that remained on the campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro—UFRRJ) from March 2019 to August 2020, aiming to recover, isolate and identify coccidian oocysts.

Materials and Methods

Sample Collection

Eight fieldworks were carried out to collect fecal samples from the flock of buff-necked ibises *T. caudatus* that remained on the Seropédica campus of UFRRJ (22° 45' 46" S, 43° 41' 18" W), from March 2019 to August 2020. The monospecific flock of ibises were observed from a distance until defecations were seen, which were then sought and found. Depending on the type of surface that the feces were found, they were discarded, giving preference to those droplets of feces shed on leaves, rocks, or other surfaces less susceptible to contamination. Each fresh droplet of feces from each individual ibis was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v).

Morphological Analyses

Fecal samples were transported to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). In laboratory, the samples were kept at room temperature (~25 °C) for 7 days in the same centrifuge tubes which were collected, being oxygenated daily by shaking until the oocysts were sporulated. Oocysts were recovered and isolated using the Sheather's method and were morphologically studied following the guidelines of Duszynski and Wilber [11] and Berto *et al.* [12]. Optical microscopy, photomicrography and morphometry were performed using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were performed using the applications Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT from CorelDRAW® Graphics Suite (Version 2020, Corel Corporation, Canada). Measurements (in micrometers) are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular Analyses

A single oocyst from each sample was individualized from serial dilutions of the oocysts in drops on a microscope slide using an automatic micropipette. The individualized oocyst was transferred to a microtube containing PBS and washed by centrifuging until the solution is clear [13]. Four freeze–thaw cycles were performed to achieve complete lysis of the oocyst. DNA extraction was performed using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil). Amplification by PCR of a partial fragment of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI)

gene (c.250 bp) was performed using nested PCR, according Dolnik *et al.* [13] and Yang *et al.* [14]. The nested PCR amplicons were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA Sequence Analyses

Nested PCR amplicons were sequenced using an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). The newly generated sequence was compared to those for coccidian species available in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The phylogenetic tree was constructed using the newly generated COI sequence aligned with coccidian species available on GenBank. Distance analyses and phylogenies were conducted using MEGA X [15]. Briefly, the nucleotide sequences were imported into MEGA X and aligned with reference sequences from GenBank using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) trees were constructed, and the distances computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA X. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

A total of 73 fecal samples were collected from buff-necked ibises and 45 were positive for coccidia. All observed oocysts were morphologically identified as *E. bazi*. This material is described below.

Family Eimeriidae Minchin, 1903
Genus *Eimeria* Schneider, 1875

Eimeria bazi Chauhan et Bhatia, 1970 (Figs. 1, 2)

Oocysts ($n=88$) ovoidal, $21\text{--}30 \times 16\text{--}21$ (26.2×18.9); length/width (L/W) ratio 1.2–1.6 (1.39). Wall bi-layered, 1.5–1.9 (1.7) thick, outer layer smooth to slightly rough, c.2/3 of total thickness. Micropyle present, robust and protruding, 4.1–5.4 (4.8) wide; occasionally with a rounded polar body attached to the micropyle, $1.6\text{--}2.3 \times 1.5\text{--}2.1$ (2.0×1.7). Oocyst residuum absent, but one or two small polar granules are present. Sporocysts ($n=30$) ovoidal to lemon-shaped, $13\text{--}15 \times 7\text{--}10$ (14.2×8.7); L/W ratio 1.4–1.8 (1.65). Stieda body present, knob-like to rounded, $0.7\text{--}1.4 \times 1.3\text{--}1.9$ (1.1×1.5); sub-Stieda body absent or vestigial; para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, composed of granules often membrane-bound in the center of the sporocyst, $3.4\text{--}5.5 \times 3.5\text{--}4.3$ (4.7×4.0), but also scattered among the sporozoites. Sporozoites vermiform, with anterior and posterior refractile bodies, but nucleus is indiscernible.

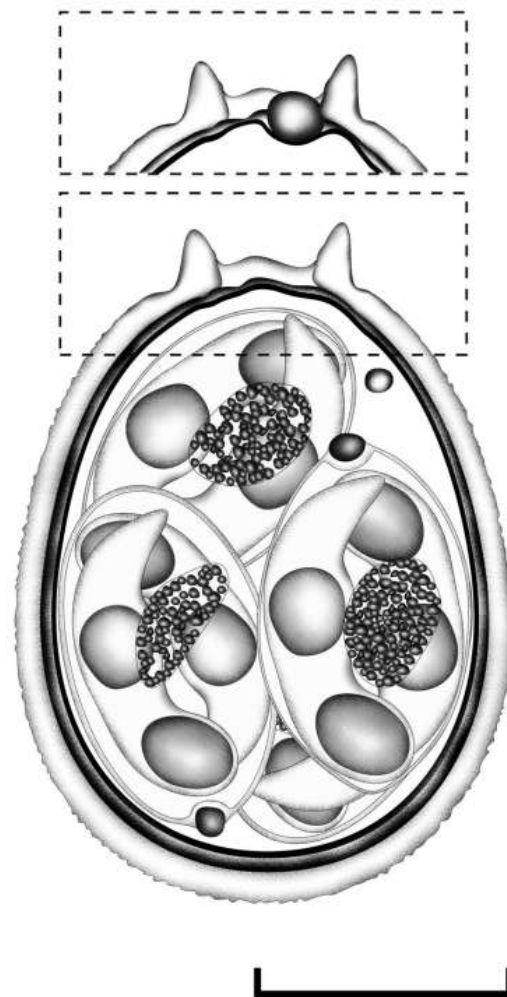


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Eimeria bazi* from the buff-necked ibis *Theristicus caudatus*, highlighting the micropyle with and without an attached polar body. Scale-bar: 10 μm

Host: *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) (Aves: Pelecaniformes: Threskiornithidae), buff-necked ibis.

Locality: Campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro ($22^\circ 45' 46''$ S, $43^\circ 41' 18''$ W), southeastern Brazil.

Representative specimens: Photomicrographs, line drawing and oocysts in 2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution (Williams *et al.* 2010) are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number 128/2022. Photographs of the host specimen are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown.

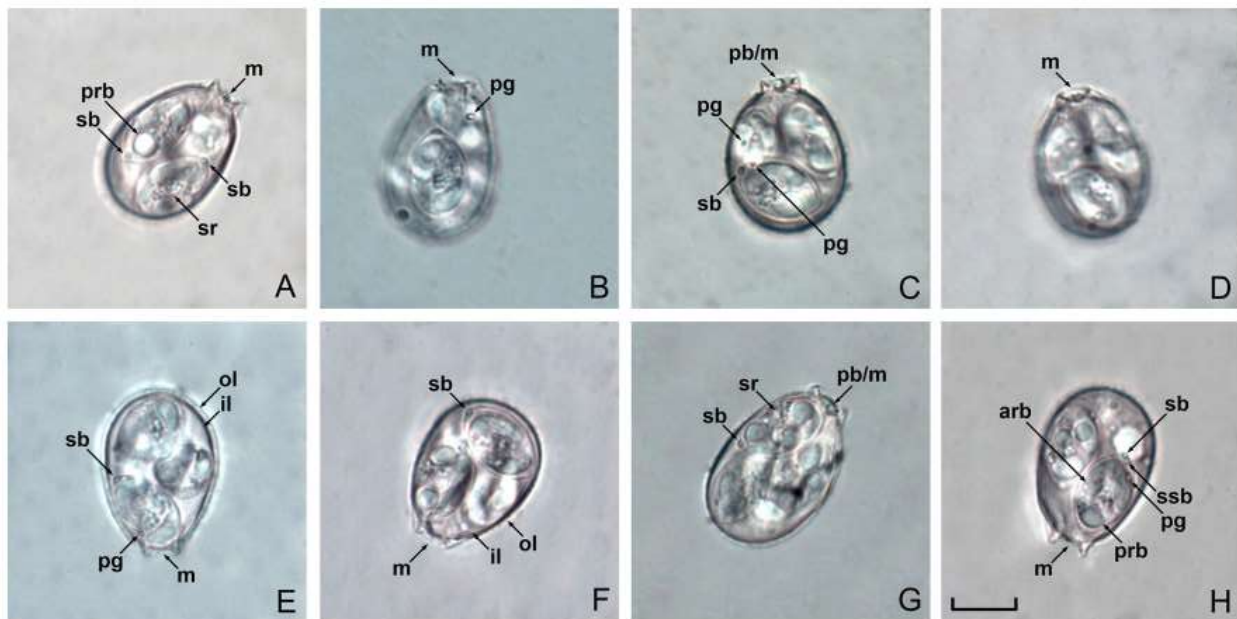


Fig. 2 Photomicrographs of sporulated oocysts of *Eimeria bazi* from the buff-necked ibis *Theristicus caudatus*. inner (il) and outer (ol) layers of the oocyst wall; micropyle (m) and polar body attached to the

micropyle (pb/m); polar granule (pg); Stieda (sb) and vestigial sub-Stieda (ssb) bodies; sporocyst residuum (sr); anterior (arb) e posterior (prb) refractile bodies. All to same scale. Scale-bar: 10 μ m

Representative DNA sequence: One representative COI sequence was deposited in the GenBank database under the accession number OM933654.

Remarks: The morphology of *Eimeria* spp. recorded from the order Pelecaniformes, in addition to the orders Suliformes and Phaethontiformes, which were related to Pelecaniformes, and of *E. bazi* identified from *T. caudatus* in this study are shown in Table 1. Nine *Eimeria* spp. are recorded in these orders: *Eimeria ardeae* Dubinin, 1939, *E. bazi*, *Eimeria pelecani* Courtney et Ernst, 1975, *Eimeria ardae* Shamsuddin et Jasim, 1980 and *Eimeria garzettae* Golemansky et Kuldjieva, 1980 from Pelecaniformes and *Eimeria roscoviensis* (Labbé, 1893), *Eimeria urnula* Hoare, 1933, *Eimeria auritusi* Yabsley, Gottdenker et Fisher, 2002 and *Eimeria phalacrocoraxae* Yabsley et Gibbs, 2006 from Suliformes. From Phaethontiformes there are no described species. As shown in Table 1, the oocysts recovered from *T. caudatus* in this study were morphologically similar with the original description of *E. bazi* from *P. papillosa* in India. In addition, only *E. roscoviensis*, *E. urnula*, *E. garzettae* and *E. phalacrocoraxae* have a micropyle and oocyst shape that are reasonably similar to the oocysts of this study; however, these species can be distinguished by their smaller sizes, pear-shaped oocysts, non-protruding micropyle and absence of polar granules in the sporulated oocyst (Table 1).

Phylogenetic analysis: DNA amplification of the oocyst of *E. bazi* showed a clear band of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 20 sequences for coccidians available on GenBank (Fig. 3). *Hepatozoon canis* (James, 1905) was used as the outgroup. *Eimeria bazi* sat separately on the cladogram for having low similarity with coccidians sequenced for the same genic region deposited in GenBank. The highest similarity was only 88.4% with *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira et Berto, 2020, which is a coccidian parasite of Neotropical passerines [16]. The closest eimerian sequence was of *Eimeria bubonis* Cawthorn et Stockdale, 1981, an owl parasite, with 86.3% similarity [17]; followed by *Eimeria cahirinensis* Couch, Blaustein, Duszynski, Shenbrot et Nevo, 1997, *Eimeria columbinae* Ortúzar-Ferreira et Berto, 2020, *Eimeria purpureicephali* Yang, Brice et Ryan, 2016 and *Eimeria dispersa* Tyzzer, 1929, which are parasites of rodents, columbiformes, psittaciformes and galliformes, respectively, with 85–86% similarity [18–21].

Discussion

The study of parasitology presupposes, among other things, the biological understanding of both the parasite and its host, because the dynamics of this ecological interaction between parasite–host can occur in a variety of ways [22, 23]. There

Table 1 Comparative morphology of *Eimeria* spp. recorded from the orders Pelecaniformes and Suliformes

Coccidia	Hosts	References	Oocysts										Sporocysts				
			Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall (µm)	Micropyle (µm)	Polar granule	Residium	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body (µm)	Sub-stieda body	Residium (µm)
<i>Eimeria rosconensis</i> (Labbé, 1893)	<i>Galus arisotelis</i> (Linnaeus, 1761) (Suliformes: Phalacrocoracidae)	Labbé [40]	Pear-shaped	16–18	14–16	–	Smooth	Inconspicuous or incomplete, with polar body	Absent	Absent	Pear-shaped	(9)	(6)	–	Present, knob-like	Absent	Membrane-bound
<i>Eimeria urnula</i> Hoare, 1933	<i>Phalacrocorax carbo</i> (Linnaeus, 1758) (Suliformes: Phalacrocoracidae)	Hoare [41]	Roughly ovoidal or pear-shaped	18–23	13–14	–	Smooth	Inconspicuous or incomplete	Absent	Absent	Ovoidal or ellipsoidal	(10.4)	(5.6)	–	Present	Absent	Membrane-bound, rounded
<i>Eimeria ardeae</i> Dubinin, 1939	<i>Adea cinerea</i> Linnaeus, 1758 and <i>Nycticorax nycticorax</i> (Linnaeus, 1758) (Pelecaniformes: Ardeidae)	Dubinin [45]	Ovoidal	45–57	32–48	–	–	Indiscernible	–	–	Elongate ovoidal	24–28	–	(0.5)	Present	–	Large
<i>Eimeria bazi</i> Chauhan et Bhatia, 1970	<i>Pseudis papillosa</i> (Temminck, 1824) (Pelecaniformes: Threskiornithidae)	Chauhan and Bhatia [10]	Ovoidal or ellipsoidal	21–28 (23.7)	16–20 (16.8)	1.2–1.7 (1.4)	Smooth, (0.7)	Prominent, 3.9–4.5	Present, 1	Absent	Ellipsoidal	10.4–13.0 (12.2)	6.5–7.8 (7.2)	–	Present, small knob-like	absent	Mass of dark granules
<i>Thersites caudatus</i> (Boddaert, 1783) (Pelecaniformes: Threskiornithidae)	Current study	Current study	Ovoidal	21–30 (26.2)	16–21 (18.9)	1.2–1.6 (1.39)	Smooth to slightly rough, 1.5–1.9 (1.7)	Robust and protruding, 4.1–5.4 (4.8), occasionally with polar body	Present, small, 1 or 2	Absent	Ovoidal to lemon-shaped	13–15 (14.2)	7–10 (8.7)	1.4–1.8 (1.65)	Present, knob-like to rounded, 0.7–1.4 × 1.3–1.9 (1.1 × 1.5)	Absent or vestigial	Membrane-bound, 3.4–5.5 × 3.5–4.3 (4.7 × 4.0)

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts	References	Sporocysts														
			Oocysts	Shape	Length (µm)	Width (µm)	LW ratio	Wall (µm)	Microspyle (µm)	Polar granule	Residium	Shape	Length (µm)	Width (µm)	LW ratio	Stieda body (µm)	Sub-stieda body
<i>Eimeria pellicani</i> Courtney et Ernst, 1975	<i>Pelecanus occidentalis</i> Linnaeus, 1766 (Pelecaniformes: Pelecanidae)	Courtney and Ernst [46]	Broadly pear-shaped to ovoidal	14–20 (17.6)	13–16 (14.2)	1.0–1.5 (1.24)	pitted, (1.1)	Absent	Present, 1	Absent	Pear-shaped	10–13 (11.0)	5–8 (6.7)	–	Present, small	Absent	Membrane-bound, spherical, 4–5×4–5
<i>Eimeria ardae</i> Shamsuddin et Jasim, 1980	<i>Ardea purpurea</i> Linnaeus, 1766 (Pelecaniformes: Ardeidae)	Shamsuddin and Jasim [47]	Subspherical	14.9–19.8 (17.6)	12.4–18.2 (15.0)	1.0–1.4 (1.2)	Pitted, (1.4)	Indistinct	Present, 1	Absent	Ovoidal	6.6–9.9 (8.0)	5.8–8.6 (6.4)	1.1–1.5 (1.3)	Present	Absent	Central, composed of fine granules
<i>Eimeria garzettae</i> Golemansky et Kuldjewa, 1980	<i>Egretta garzetta</i> (Linnaeus, 1766) (Pelecaniformes: Ardeidae)	Golemansky and Kuldjewa [44]	Subspherical or ovoidal	17.6–21.2	14.4–16.2	–	Smooth to sculptured, 1.2–2.0	Distinct, with polar body of 3 µm	Present, 1–2	Absent	Pear-shaped	9–11	6–8	–	Present, pointed	Absent	Compact
<i>Eimeria auritisi</i> Yabsley, Grottenker et Fisher, 2002	<i>Nannopterum auritus</i> (Lesson, 1831) (Suliformes: Phalacrocoracidae)	Yabsley et al. [48]	Subspherical	14–19 (16.5)	14–18 (16.1)	1.0–1.2 (1.0)	Pitted, (1.0)	Absent	Absent	Present, small, 4–8 granules	Ovoidal	8–11 (9.3)	6–7 (6.6)	(1.4)	Absent	Absent	Scattered
<i>Eimeria phalacrocoraxae</i> Yabsley et Gibbs, 2006	<i>Phalacrocorax auritus</i> (Lesson, 1831) (Suliformes: Phalacrocoracidae)	Yabsley and Gibbs [42]	Ovoidal	16–18.5 (17.1)	13–17 (14.7)	1.03–1.29 (1.17)	Smooth, with bumps, (1.0)	Prominent, 4.0–4.5, with large polar body	Absent	Absent	Ovoidal	8.5–10.5 (9.6)	5.0–6.5 (5.9)	1.3–1.8 (1.63)	Present, small	Absent	Membrane-bound

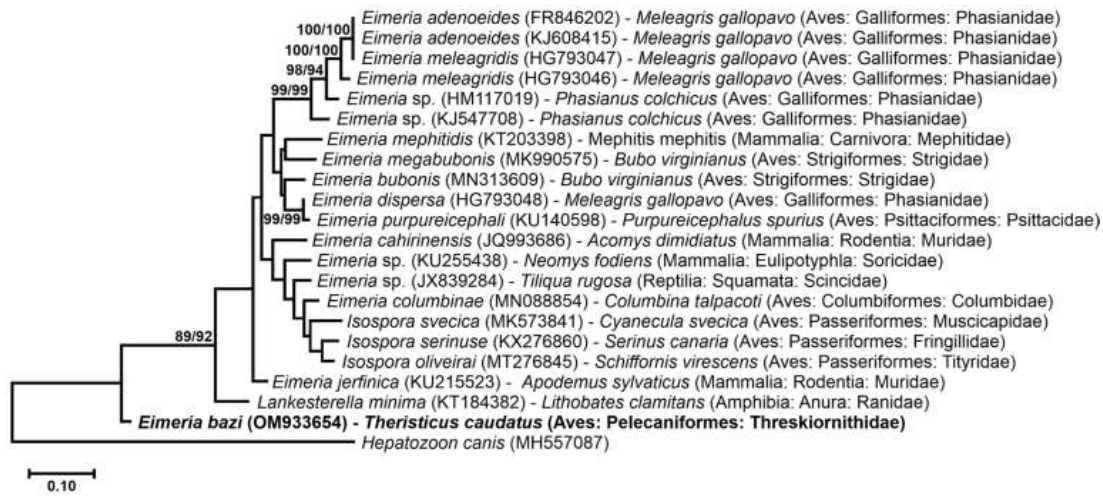


Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for neighbor-joining and maximum likelihood,

respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site

are parasites that are specific to a group of susceptible hosts, while others parasitize a wide range of hosts, thus being generalists [22]. The overwhelming part of the scientific literature on eimeriid coccidia follows the guidelines of Duszynski and Wilber [11], that these parasites are minimally specific at the familial level of their hosts; therefore, to describe a new species, it is necessary to have a detailed morphological comparison with other congeneric species already described for the same host family [11].

So far only *E. bazi* has been recorded in the Threskiornithidae family. This coccidian species was originally described in Asia, from red-naped ibises *P. papillosa*, which have a geographic distribution restricted to India, Nepal and Pakistan [24]. In this context, it is unlikely that *E. bazi* was directly transmitted from *P. papillosa* to *T. caudatus*, as these birds are allopatric inhabiting distinct and distant continents. On the other hand, many ibises are migrants and/or have very wide geographic distributions, being observed on all continents, with the exception of Antarctica [25]. The glossy ibis *Plegadis falcinellus* (Linnaeus, 1766), which is observed in Oceania, Asia, Africa, Europe and in South, Central and North America, can be highlighted by its migratory potential and wide intercontinental distribution [24]. The Eurasian spoonbill *Platalea leucorodia* Linnaeus, 1758, in turn, is distributed as resident in Europe, Asia and Africa, but is reported as vagrant in Brazil [24]. Thus, these and other migrant and/or intercontinental ibises could be transmitters/dispersers of coccidians for susceptible threskiornithid birds on all continents, including *P. papillosa* and *T. caudatus*, which have more restricted distributions [26]. Studies such as those by Silva *et al.* [27] and Silva-Carvalho *et al.* [28] exemplify the dispersal potential of coccidian

parasites. In addition, the report of eimerian oocysts from northern bald ibises *Geronticus eremita* (Linnaeus, 1758) and African sacred ibises *Threskiornis aethiopicus* (Latham, 1790), which records at least one *Eimeria* sp. on the African continent from Threskiornithidae reinforces the assumption of the intercontinental dispersion of *E. bazi*; however, it would be unwise to identify these eimerian oocysts of these african ibises as *E. bazi* outside India, as in these studies none of the oocysts were specifically identified, described, or named [29–31].

Another possibility that should be considered is the anthropogenic dispersion of coccidia through the trade/trafficking of wild animals [26]. An example is the zoos and breeding sites that are qualified to receive wild animals from the most diverse parts of the world. *Isospora araponga* Doležalová, Torres, Fernández et Modrý, 2004 was described from bare-throated bellbirds *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) imported to Barcelona Zoo from Brazil [32]. Berto *et al.* [33] reported *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) in Brazil from greylag geese *Anser anser* (Linnaeus, 1758), an Asian species that is commonly traded as a domestic animal in several regions of the world [24]. In this way, the trade/trafficking of wild animals can allow the dispersion/transmission of coccidia among naturally allopatric birds.

Still on the geographic distribution of ibises, it is worth mentioning that *T. caudatus*, despite being typical of open environments, such as cerrado and fields, has expanded its geographic distribution in recent years to other biomes, which were originally forested, such as the Atlantic Forest [5, 7, 34]. This biogeographic expansion has been potentiated by changes in these habitats resulting from deforestation, in addition to the large increase in the creation of

pasture fields, providing the emergence of environments similar to the original habitat of this bird [35]. Thus, these new open areas of anthropogenic origin provide an ideal habitat for the permanence of *T. caudatus*. One of the consequences of this expansion of the geographic distribution of *T. caudatus* is the dispersion of its coccidia in new areas, including for new host species that previously would not have sympatry with this bird in its native habitat. Along with that, the very high densities of oocysts (above 100,000), observed in some droplets of feces collected from *T. caudatus* in the present study may cause epizootic diseases in host populations, especially those without previous contact with the parasite [26]. This may occur considering that the symptoms of coccidiosis must be closely related to the amount of oocysts ingested, in addition to other factors [2, 36].

In the absence or when there is a low number of descriptions of coccidian species in a host family is suitable the comparison with coccidian species recorded in higher taxa of the host [16]. Thus, although the oocysts recovered from *T. caudatus* in the current study are morphologically identifiable as *E. bazi*, which is the only recorded species of the host family Threskiornithidae, these were also compared with the coccidians described in the next higher taxon, in this case, the order Pelecaniformes. Recent studies have shown that the traditional Pelecaniformes are actually a polyphyletic group; therefore, several taxonomic rearrangements were proposed in a new classification that included two new orders, Suliformes and Phaethontiformes, from the traditional Pelecaniformes. Furthermore, it is noteworthy that the family Threskiornithidae belonged to the order Ciconiiformes; however, currently the order Ciconiiformes has only the family Ciconiidae, and Threskiornithidae along with other families were reclassified to the order Pelecaniformes [4, 6, 37–39]. Thus, aiming to expand the comparative morphology of *E. bazi*, *Eimeria* spp. recorded from Pelecaniformes, Suliformes and Phaethontiformes were included in this study, obtaining nine *Eimeria* spp. for morphological comparison (Table 1).

The first described species of these traditional Pelecaniformes was *Eimeria roscoviensis* (Labbé, 1893) from European shags *Gulosus aristotelis* (Linnaeus, 1761) in Roscoff, France. This species was originally described as *Coccidium roscoviense* Labbé, 1893 before being correctly classified in the genus *Eimeria* [40]. Two later described species of birds of the same host family (Phalacrocoracidae), *Eimeria urnula* Hoare, 1933 and *Eimeria phalacrocoraxae* Yabsley et Gibbs, 2006, are very similar to each other, both morphometrically and morphologically, mainly due to the typical micropyle with a polar body (Table 1) [41, 42]. This observation shows the possibility of these coccidians being a single species, or being closely related species that have co-evolved from an ancestral eimeriid that parasitized an ancestral bird of the Phalacrocoracidae, in the process named co-speciation [26,

43]. In the oocysts identifiable as *E. bazi* in this study, as well as in its original description [10] and in *E. garzettae* [44], this same type of oocyst shape and size, including the micropyle with polar body, are observed (Table 1), showing that perhaps the common ancestor of these *Eimeria* spp. may have started parasitism even earlier in the evolution of Pelecaniformes and Suliformes [26, 43]. This assumption is reinforced by the findings of Labbé from the description of *E. roscoviensis*, still in the late nineteenth century, who observed oocysts of the same morphotype as *E. roscoviensis* from Charadriiformes of the genera *Charadrius* Linnaeus, 1758, *Arenaria* Brisson, 1760, *Numenius* Brisson, 1760, *Tringa* Linnaeus, 1758 and *Calidris* Merrem, 1804, showing that the diversity of hosts susceptible to these *Eimeria* spp. with polar bodies attached to the micropyle may be even larger [40].

The other species *Eimeria ardeae* Dubinin, 1939, *Eimeria pelecani* Courtney et Ernst, 1975, *Eimeria ardae* Shamsuddin et Jasim, 1980 and *Eimeria auritusi* Yabsley, Gottdenker et Fisher, 2002 do not have the typical morphology observed in the previous species, as they do not have micropyle and are subspherical as in the case of *E. auritusi* and *E. ardae*; therefore, these must have another evolutionary origin [45–48]. The answers to these phylogenetic questions of these *Eimeria* spp. of Pelecaniformes, Suliformes, and also Charadriiformes, could be conclusive by means of phylogenetic molecular analyses. However, of all *Eimeria* spp. related in this study, only *E. auritusi* and *E. phalacrocoraxae* were sequenced for a region of the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene, unlike in this study, where *E. bazi* was sequenced for a genic region of the COI, and therefore, these species did not appear in the cladogram of Fig. 3. The sequencing of the 18S gene was intended in this study, but its amplification was not successful, perhaps due to the use of DNA extraction methodology from an individual oocyst that provides few copies of nuclear DNA, unlike the greater amount of mitochondrial DNA available in each oocyst. In any case, the use of the 18S gene for species differentiation and detection of recent evolutionary events has been shown to be unsuitable, whereas the COI gene has been considered the most suitable in this sense [49, 50]. Thus, when a greater number of *Eimeria* spp. of these birds have been sequenced, the phylogenetic analysis should be more conclusive, as, so far, the phylogenetic analysis for the COI gene has only shown that *E. bazi* is distant and paraphyletic from some coccidia groups of passeriform and non-passeriform birds (Fig. 3).

Finally, after the detailed morphological study of the oocysts recovered from *T. caudatus* in the current study and considering the migratory potential and worldwide distribution of ibises, in addition to other possibilities, *E. bazi* is reported for the first time in South America from a new host, *T. caudatus*. As an additional element, this study provided

the first genetic sequencing by the COI gene for this coccidian species.

Acknowledgements We thank Dr. Donald W. Duszynski (Emeritus Professor of Biology, University of New Mexico), the Biblioteca de Ciências Biomédicas of the Fundação Oswaldo Cruz, the Central Library of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, and the Library of the Museu Nacional of the Universidade Federal do Rio de Janeiro, for providing us with old and rare scientific articles that were essential for the conclusion of this study.

Author contributions The study was designed by VML, IF and BPB. Field work was performed by IF and RBGC. Laboratory procedures for maintenance, recovery, measurements, photomicrographs and isolation of oocysts were performed by RBGC, CNO-F and MSO. DNA extraction, amplification and sequencing were performed by ERM, AAO and VML. BPB analyzed the data and drew the coccidian oocyst. The manuscript was written by RBGC, CNO-F and BPB and subsequently revised by all other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). RBGC has a scholarship from CNPq (Grant/Award number: 170041/2018-2). CNO-F has a scholarship from CNPq/UFRRJ (Grant/Award Number: PVBS2485-2021). MSO has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award number: E-26/204.228/2021). BPB has fellowships from CNPq (Grant/Award number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award number: E-26/202.797/2019).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICM-Bio (license 42798) and CEUA/IV/UFRRJ (protocol 6606250616). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD, Kirk PM (2015) Correction: a higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE* 10:e0130114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Fayer R (1980) Epidemiology of protozoan infection the coccidia. *Vet Parasitol* 6:75–103. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(80\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(80)90039-4)
- Duszynski DW, Couch L, Upton SJ (2000) The Coccidia of the World. <https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>. Accessed 1 Mar 2022
- Clements JF, Schulenberg TS, Iliff MJ, Billerman SM, Fredericks TA, Gerbracht JA, Lepage D, Sullivan BL, Wood CL (2021) The eBird/clements checklist of birds of the World: version 2021. <https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>. Accessed 01 March 2022.
- Matheu E, delHoyo J, Garcia EFJ, Boesman PFD (2020) Buff-necked Ibis (*Theristicus caudatus*), version 1.0. In: delHoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds) Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca. <https://doi.org/10.2173/bow.bunibil.01>. Accessed 1 Mar 2022.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro
- Serpa GA, Pacheco JF, Lima LM, Parrini R, Pimentel LS, Pinto MFR, Antonini RD, Rajão H, Oliveira AH, Tavares DC, Siciliano S, Mallet-Rodrigues F, Luz HR, Soares BR, Crud N (2010) A curicaca, *Theristicus caudatus* (Ciconiiformes: Threskiornithidae) no estado do Rio de Janeiro: revisão dos registros e novas observações. *Atual Ornitol* 153:62–68
- Cabral RBG, Ferreira I (2012) Primeiro registro de *Theristicus caudatus* (Pelecaniformes, Threskiornithidae) em Seropédica. *RJ Atual Ornitol* 165:10–11
- Dolnik OV, Dolnik VR, Bairlein F (2010) The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98:97–103. <https://doi.org/10.5253/078.098.0112>
- Chauhan PPS, Bhatia BB (1970) Eimerian oocysts from *Pseudibis papillosa*. *Indian J Microbiol* 10:53–54
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian faeces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ortúzar-Ferreira CN, Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Mello ER, Thode-Filho S, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) *Isoospora oliveirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. *Acta Parasitol* 65:843–851. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00237-8>
- McAllister CT, Hnida JA, Woodyard ET, Rosser TG (2019) *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from great horned owls, *Bubo virginianus* (Gmelin) (Aves: Strigiformes) from Arkansas and Oklahoma, USA, with novel molecular information on *Eimeria bubonis* Cawthorn & Stockdale, 1981. *Syst Parasitol* 96:695–702. <https://doi.org/10.1007/s11230-019-09881-9>
- Kvičerová J, Hypša V (2013) Host-parasite incongruences in rodent *Eimeria* suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. *PLoS ONE* 8:e63601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063601>
- Vrba V, Pakandl M (2014) Coccidia of turkey: from isolation, characterisation and comparison to molecular phylogeny and molecular diagnostics. *Int J Parasitol* 44:985–1000. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.06.004>
- Yang R, Brice B, Ryan U (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria purpureicephali* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in a red-capped parrot (*Purpureicephalus spurius*, Kuhl, 1820) in Western Australia. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 5:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.003>

21. Ortúzar-Ferreira CN, Oliveira MS, Genovez-Oliveira JL, Franco HA, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. *Parasitol Res* 119:267–281. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06514-4>
22. Ferreira LF (1973) O fenômeno parasitismo. *Rev Soc Bras Med Trop* 3:261–277. <https://doi.org/10.1590/S0037-8682197300040006>
23. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (2008) Parasitic diseases of wild birds. Wiley-Blackwell, Singapore
24. BirdLife International (2016) The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 23 May 2022
25. Billerman M, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg TS (2022) Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca. <https://birds.oftheworld.org/bow/home>. Accessed 23 May 2022
26. Berto BP, Lopes CWG (2020) Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. *J Parasitol* 106:707–713. <https://doi.org/10.1645/19-148>
27. Silva LM, Rodrigues MB, Pinho IF, Lopes BB, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG, Berto BP (2017) Some remarks on the distribution and dispersion of coccidia from icterid birds in South America: *Isospora guaxi* n. sp. and *Isospora bellicosa* Upton. Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique *Cacicus haemorrhous* (L.) (Passeriformes: Icteridae) in Southeastern Brazil. *Syst Parasitol* 94:151–157. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9688-y>
28. Silva-Carvalho LM, Pastura DG, Rodrigues MB, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Genovez-Oliveira JL, Soares SS, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2018) *Isospora sagittulae* McQuisition & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitol Res* 117:2635–2641. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5955-y>
29. Frigerio D, Cibulski L, Ludwig SC, Campderrich I, Kotschal K, Wascher CAF (2016) Excretion patterns of coccidian oocysts and nematode eggs during the reproductive season in Northern Bald Ibis (*Geronticus eremita*). *J Ornithol* 157:839–851. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1317-z>
30. Parsani HR, Momin RR, Sahu RK, Patel BG (2003) Prevalence of gastro-intestinal parasites in captive birds at Kalma Nehru Zoological Garden, Kankaria Zoo, Ahmedabad, Gujarat. *Zoo's Print J* 18:987–992
31. Bastian S, Yesou P, Clergeau P, Laroucau K, Pellerin JL, Hars J, Bazus J, Passet A, Lagrange P, L'Hostis M (2010) Éléments pour l'évaluation des risques sanitaires liés aux Ibis sacrés (*Threskiornis aethiopicus*) en France. Rapport d'étude pour la Direction Régionale de l'Environnement Bretagne et la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement des Pays de la Loire. https://controverses.minesparis.psl.eu/public/promo15/promo15_G6/www.oncfs.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_ibis_pathogenes.pdf. Accessed 1 Mar 2022
32. Doležalová M, Torres J, Fernández H, Modrý D (2004) *Isospora araponga* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of *Isospora* Schneider from a bare-throated bellbird, *Procnias nudicollis* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Cotingidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:829–830. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800008>
33. Berto BP, Teixeira M, Lopes CWG (2007) *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) in the greylag goose (*Anser anser* Linnaeus, 1758) in southeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 16:156–158. <https://doi.org/10.1590/S1984-2961200700300008>
34. WikiAves (2022) Wiki Aves—A Enciclopédia das Aves do Brasil. <https://www.wikiaves.com.br/wiki/curicaca>. Accessed 01 Mar 2022
35. Sigrist T (2014) Guia de Campo: Avifauna Brasileira. Avis Brasilis, São Paulo
36. Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P (1995) Biotechnology—guidelines on techniques in Coccidiosis Research. European Commission, Luxembourg
37. Ericson PGP, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JL, Parsons TJ, Zuccon D, Mayr G (2006) Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biol Lett* 2:543–547. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0523>
38. Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han KL, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008) A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320:1763–1768. <https://doi.org/10.1126/science.1157704>
39. Mayr G (2011) Metaves, Mirandornithes, Strisores and other novelties—a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds. *J Zool Syst Evol Res* 49:58–76. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00586.x>
40. Labbé A (1893) Sur les coccidies des oiseaux. *C R Seances Acad Sci* 117:407–409
41. Hoare CA (1933) Studies on some new ophidian and avian coccidian from Uganda, with a revision of the classification of the Eimeriidae. *Parasitol* 24:359–388. <https://doi.org/10.1017/S0031182000019569>
42. Yabsley MJ, Gibbs SE (2006) Description and phylogeny of a new species of *Eimeria* from double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) near Fort Gaines, Georgia. *J Parasitol* 92:385–388. <https://doi.org/10.1645/GE-592R.1>
43. Gardner SL, Duszynski DW (1990) Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subtterranean rodents in Bolivia. *J Parasitol* 76:805–811 (3282798)
44. Golemansky V, Kuldjjeva D (1980) *Eimeria garzettae* sp. n. (Coccidia: Eimeriidae) in the little egret (*Egretta garzetta*) from Bulgaria. *Acta Protozoologica* 19:177–179
45. Dubinin VB (1939) The coccidiosis of the herons in the state Astrakhan reserve. *Seriya Biologicheskikh Nauk* 11:44–57
46. Courtney CH, Ernst JV (1975) *Eimeria pelecani* sp. n. from the brown pelican, *Pelecanus occidentalis carolinensis*, from Florida. *J Parasitol* 61:1081–1082. <https://doi.org/10.2307/3279380>
47. Shamsuddin M, Jasim MK (1980) Coccidia of some birds and mammals from Iraq. *Bull Nat Hist Res Centre* 7:81–109
48. Yabsley MJ, Gottdenker NL, Fischer JR (2002) Description of a new *Eimeria* sp. and associated lesions in the kidneys of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). *J Parasitol* 88:1230–1233. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1230:DOANES\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1230:DOANES]2.0.CO;2)
49. Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *Int J Parasitol* 41:843–850. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>
50. Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitol Int* 75:102040. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102040>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Rísia Brígida Gonçalves Cabral¹ · Carlos Nei Ortúzar-Ferreira² · Mariana de Souza Oliveira¹ · Ericson Ramos de Mello³ · Águida Aparecida de Oliveira⁴ · Viviane Moreira de Lima⁵ · Ildemar Ferreira⁵ · Bruno Pereira Berto⁵ 

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

² Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23890-000, Brazil

Molecular identification of *Isoospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil

CARLOS NEI ORTÚZAR-FERREIRA¹, LUCAS DE ASSIS S. ANDRADE², JHON LENNON GENOVEZ-OLIVEIRA², MARIANA S. OLIVEIRA², ERICSON R. MELLO⁶, SERGIAN V. CARDOZO⁷, ÁGUIDA A. OLIVEIRA⁸, VIVIANE M. LIMA^{9,10}, ILDEMAR FERREIRA^{9,11} & BRUNO P. BERTO^{9*}

¹Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil. [✉ carlosneiortuzarferreira@gmail.com](mailto:carlosneiortuzarferreira@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-0177-5591>

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil

³[✉ lucasandrade.as@hotmail.com](mailto:lucasandrade.as@hotmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-8203-9299>

⁴[✉ jhongenovezoliveira30@gmail.com](mailto:jhongenovezoliveira30@gmail.com); <http://orcid.org/0000-0003-2994-397X>

⁵[✉ mariana.s.o@hotmail.com](mailto:mariana.s.o@hotmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-9594-0633>

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil.

[✉ melloericson@gmail.com](mailto:melloericson@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-7350-0562>

⁷Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, 25071-202 Duque de Caxias, RJ, Brazil. [✉ sergianvc@gmail.com](mailto:sergianvc@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0003-2990-7936>

⁸Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil. [✉ aguidaoliveira@gmail.com](mailto:aguidaoliveira@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-8685-0345>

⁹Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil.

¹⁰[✉ vilima@ufrj.br](mailto:vilima@ufrj.br); <https://orcid.org/0000-0001-7930-8312>

¹¹[✉ guaraitibanofeliz@gmail.com](mailto:guaraitibanofeliz@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-6128-5789>

*Corresponding author. [✉ bertobp@ufrj.br](mailto:bertobp@ufrj.br); <https://orcid.org/0000-0002-1072-5254>

Abstract

Isoospora coerebae Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 is a coccidian protozoan described from bananaquits *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758), on Marambaia Island, which is located on the southeastern Brazilian coast. In this current work, *I. coerebae* is identified from *C. flaveola* in a protected area close to Marambaia Island, but on the mainland, establishing a new location of parasitism, in addition to providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of two regions of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene. Its oocysts are sub-spherical, 24.4 × 22.9 µm, with smooth, bilayered wall, ~1.7 µm thick. Micropyle, polar granules and oocyst residuum are absent. Sporocysts are elongate ovoidal, 17.6 × 10.5 µm. Stieda body prominent and rounded and sub-Stieda body short and wide. Sporocyst residuum is composed of scattered granules of different sizes. Sporozoites are vermiform with a prominent posterior refractile body. The oocysts of the current work are morphologically equivalent to the original description of *I. coerebae*, which have a typical and easily identifiable morphology, mainly in the Stieda and Sub-Stieda bodies. The two sequenced gene regions of the COI gene approximated *I. coerebae* to *Isoospora* spp. from Southeastern Brazil, but also from *Isoospora* spp. from passerines of North America, Europe and Asia. Although there is a small overlap between the two genic regions sequenced in the current work, it is estimated that the longer COI sequence, which was recently designed and still not widespread, should show better phylogenetic results in the future.

Key words: taxonomy, genotypic characterization, sequencing, coccidia, *Isoospora*, oocysts, Passeriformes, COI

Introduction

Coccidia are obligate intracellular protozoa, parasites of the intestinal tract of its hosts, with a cosmopolitan distribution and a biological cycle consisting of merogony, gametogony and sporogony (Levine 1985). These protozoans

infect a wide range of hosts, from arthropods to mammals (Tenter *et al.* 2002; Ghemiri 2010). Coccidians of Eimeriidae are monoxenes, with *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Berto *et al.* 2011; Berto & Lopes 2013) being the most representative genera in birds (Berto *et al.* 2011; Berto & Lopes 2013). In general, these microorganisms have an enzootic parasitic relationship, without major harm to its host or none at all. However, it is also known as the causative agents of coccidiosis, a parasitic disease that widely affects farm animals, causing economic losses and being strongly associated with environmental stress and poor management conditions (Fayer 1980; Júnior *et al.* 2009; Chapman *et al.* 2013).

The identification of coccidians is primarily conducted through the morphological identification of the oocysts, which are the exogenous structure of environmental resistance of the coccidians, shed in the feces of the host and infective when sporulated. However, currently the molecular studies have been increasingly required to provide molecular phylogenetic analysis and confirm and/or complement species identification (Tenter *et al.* 2002; Ogedengbe *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2021).

In this context, *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 is a coccidian described by morphological and morphometric studies of their oocysts recovered from fecal samples of bananaquits *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) in the Marambaia Island, on the Brazilian coast (Berto *et al.* 2010). Consequently, in this current work *I. coerebae* is identified from *C. flaveola* in a protected area close to Marambaia Island, but on the mainland, establishing a new parasitism locality, as well as providing a preliminary genotypic characterization via sequencing of two regions of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene.

Material and methods

Sample collection. A total of four expeditions were conducted in an environmental protection area, established in Brazil as a Private Natural Heritage Reserve (Reserva Particular do Patrimônio Natural - RPPN), named as Porangaba, in the Municipality of Itaguaí, in the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil (22°48'29.83"S; 43°49'38.77"W). These were carried out in the months of July, August, September and October 2018. Only one bananaquit *C. flaveola* was captured with mist nets. The bananaquit was kept in individual boxes and feces collected immediately after defecation. After identification of the species (Sigrist 2014), the bird was photographed and released and fecal samples were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v). Field-collecting permits were issued to B. P. Berto by SISBIO/ICMBio (license 42798) and CEUA/UFRRJ (protocol IV-6606250616).

Morphological analyses. Fecal samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), where they were incubated at room temperature (20–25°C) for one week. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto *et al.* (2014). Morphological observations, photomicrographs, and measurements were made with the use of an Olympus BX41 binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy) connected to a computer running the software BELView (Version 6.2.3.0, BEL Engineering, Monza, Italy). All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Isolation of an individual oocyst and DNA extraction. An individual oocyst was isolated from serial dilutions of the oocysts in drops on a microscope slide using a sterile micropipette. This isolated oocyst was resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik *et al.* 2009). DNA was extracted from the oocyst using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction (Yang *et al.* 2014).

Amplification of ~250 bp of the COI gene (COI1). The PCR amplification of approximately 250 bp of the COI gene (COI1) was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik *et al.* (2009) and Yang *et al.* (2015). The external primers: COIbF1 (5'-GWTCATTAGTATGGGCACATCA-3') and COIbR1 (5'-CCAAGAGATAATACRAARTGGAA-3'), produced a PCR product size of ~302pb. The internal primers: COIbF2 (5'-GGGCATCATATGATGAC-3') and COIbR2 (5'-ATAGTATGTATCATGTARWGCAA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 10µL of 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µL of 25mM MgCl₂, 1 µL of

10mM dNTP's, 0,4µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µL of DNA (for primary reaction) or 3µL primary PCR product (for secondary reaction). Both primary and secondary PCR's were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 47°C for 45 sec, and 72°C for 1min and a final extension of 72°C for 5min. The amplicons from the second round PCRs were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

Amplification of ~650 bp of the COI gene (COI2). The PCR amplification of approximately 650 bp of the COI gene (COI2) was carried out as previously described by Genovez-Oliveira *et al.* (2020). The primers: JAVF (5'-CT-GAATTTGGTTCAGGTGTTGGT-3') and JAVR (5'-TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG-3') produced a PCR product size of ~651pb. For amplification, a 25 µL PCR reaction was prepared using 3µL of genomic DNA (<1 µg), 12.5µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0,25 µL of each Primer (0.2µM) and 9µL of Nuclease Free Water. PCR was conducted using the following cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 53°C for 45 sec, and 72°C for 50 sec and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses. All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Alignments were created in MEGA v10.2.6 using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Phylogenetic relationships were reconstructed using Bayesian Inference in the MrBayes v3.2.7 (Ronquist *et al.* 2012) and using Maximum likelihood method in the MEGA (Kumar *et al.* 2018). The best fitting evolutionary models for all phylogenetic analyses was selected by the Model Selection in MEGA. Bayesian Inference analysis was conducted under the GTR+G evolutionary model for 1,000,000 generations, and the trees were summarized after removing 25% of burn-in. Maximum likelihood analysis was conducted under the TN93+G evolutionary model, and the bootstrap values were calculated by 1,000 replicates. The resultant phylogenetic trees were visualized in the MrBayes and MEGA, exported in FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), and edited in Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Version 2020, Corel Corporation, Canada).

Results

The captured bananaquit *C. flaveola* was apparently healthy and eliminated oocysts of a single morphotype, which was morphologically identified as follows:

Isospora coerebae Berto, Flausino, Luz, Ferreira and Lopes, 2010

Host: Bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae)

Locality: Private Natural Heritage Reserve of Porangaba (22°48'29.83''S; 43°49'38.77''W), Municipality of Itaguaí, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs are deposited and available (<http://r1.ufrrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 115/2021. Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COI1 and COI2 genic regions showed clear bands around ~250 bp and ~650 bp, respectively. Representative sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers: OK194671 (COI1); and OK194672 (COI2).

Site of infection: Unknown.

Prevalence: 100% (1/1).

Sporulation: Exogenous. All oocysts were passed in the feces unsporulated and were fully sporulated by day 7 in K₂Cr₂O₇ solution at room temperature (20–25°C).

Morphology (Fig 1A-F): Oocyst (n = 15) sub-spherical, 22–27 × 22–25 (24.4 × 22.9); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1 (1.07). Wall bi-layered, smooth outer wall about 2/3 total thickness, 1.5–1.8 (1.7). Micropyle, polar granules and oocyst residuum absent. Sporocyst elongate ovoidal, 16–19 × 10–11 (17.6 × 10.5); L/W ratio 1.6–1.8

(1.67). Stieda body present, prominent and rounded, $1.3\text{--}1.5 \times 1.9\text{--}2.3$ (1.4×2.1). Sub-Stieda body present, short and wide, $1.0\text{--}1.6 \times 3.1\text{--}3.7$ (1.3×3.5). Para-Stieda body absent. Crystalloid body sometimes present in the center of the sporocyst. Sporocyst residuum present, composed of many scattered granules of different sizes. Sporozoites vermiform, with a prominent posterior refractile body.

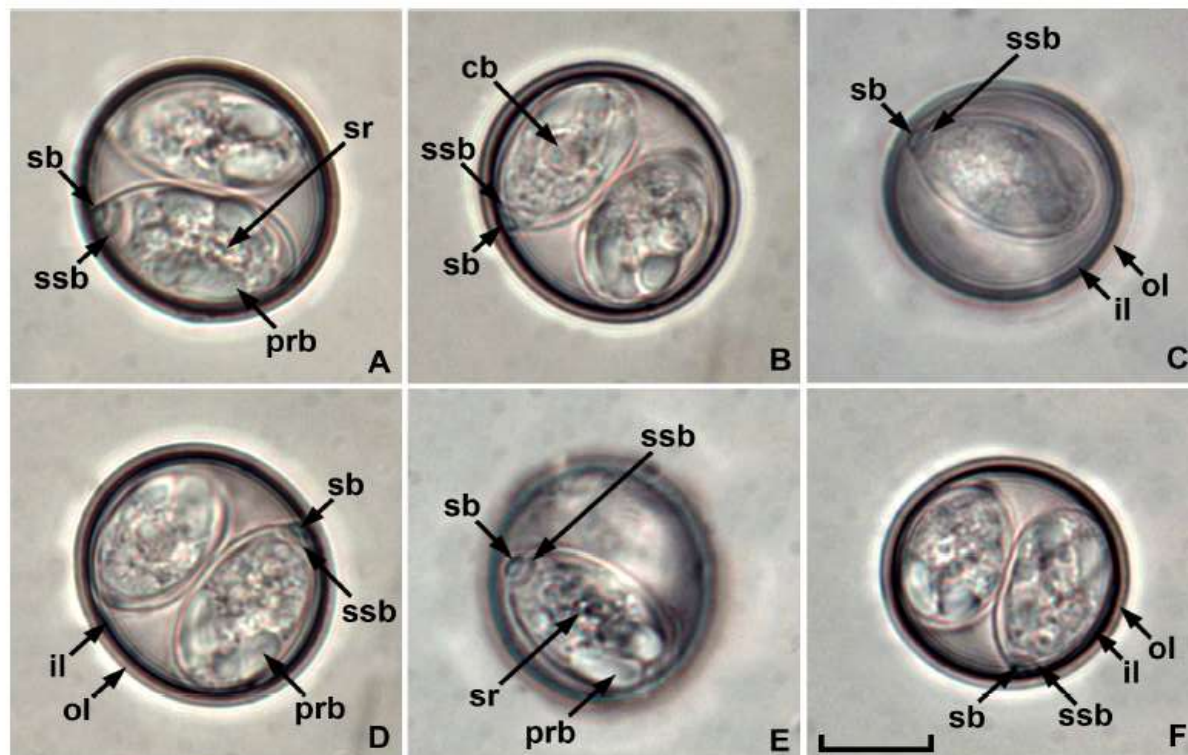


FIGURE 1. Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora coerebae*, a coccidium species recovered from the bananaquit *Coereba flaveola* from Southeastern Brazil. Note the posterior refractile body (prb), crystalloid body (cb), inner (il) and outer (ol) layer of the oocyst wall, sporocyst residuum (sr) and the Stieda (sb) and sub-Stieda (ssb) bodies. Scale-bar = 10 μm .

Remarks: The oocysts recovered from the bananaquit in the current work are morphologically equivalent to the original description of *I. coerebae*, which have a typical and easily identifiable morphology, mainly in the Stieda and Sub-Stieda bodies (Berto *et al.* 2010). Table 1 compares the morphology and morphometry of the oocysts from the current work with those from the original description of *I. coerebae*. The typical morphology of the Stieda and Sub-Stieda bodies of *I. coerebae* are the basis of differentiation from another congeneric species, *Isospora cagasebi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira and Lopes, 2008, which has the same host- and locality-types: *C. flaveola* in the Marambaia Island (Berto *et al.* 2008) (Table 1). However, in the current work no oocyst of *I. cagasebi* was observed, which, despite being similar in some characteristic features to *I. coerebae*, their sporocysts have knob-like Stieda body and prominent Sub-Stieda body, while *I. coerebae* has rounded Stieda body and short and wide Sub-Stieda body (Berto *et al.* 2010).

Phylogenetic analysis: Phylogenetic analysis included sequences from coccidians available in GenBank (Figs. 2; 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) was used as the outgroup. In the phylogenetic analysis based on the COI1 gene (Fig. 2), *I. coerebae* was recovered in a clade with the highest similarity of 99% with *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira and Lopes, 2008 from black-goggled tanagers *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) of the Itatiaia National Park, which is located in the mountainous region in the interior of Southeastern Brazil. In the COI2 based phylogenetic analysis (Fig. 3), *I. coerebae* sat in a large clade with *Isospora* spp. from passerines of North America, Europe and Asia, with the highest similarity of 98% with *Isospora greineri* Hafeez, Stasiak, Delnatte, El-Sherry, Smith and Barta, 2014 from superb starlings *Lamprotornis superbus* Rüppell, 1845 at the Toronto Zoo, Toronto, Canada.

TABLE 1. Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from *Coereba flaveola* of different localities in the Southeastern Brazil.

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts								
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residium	Microspyle	Polar granule	
<i>Isoospora coerebae</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Coereba flaveola</i>	Marambaia Island Private Natural Heritage Reserve of Porangaba	Berto <i>et al.</i> (2010) current work	sub-spherical	23–27 (24.7) 22–27 (24.4)	21–26 (23.3) 22–25 (22.9)	1.0–1.1 (1.1)	smooth	absent	absent	absent	absent
<i>Isoospora cagasebi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008	<i>C. flaveola</i>	Marambaia Island	Berto <i>et al.</i> (2010)	sub-spherical	23–27 (25.2)	23–25 (24.5)	1.0–1.1 (1.1)	smooth	absent	absent	absent	absent
Continued.												
Coccidia	Hosts	Locality	References	Sporocysts								
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium		
<i>Isoospora coerebae</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Coereba flaveola</i>	Marambaia Island Private Natural Heritage Reserve of Porangaba	Berto <i>et al.</i> (2010) current work	elongate ovoidal	16–19 (17.7) 16–19 (17.6)	10–12 (10.9) 10–11 (10.5)	1.5–1.8 (1.6) 1.6–1.8 (1.67)	prominent and rounded	short and wide	short and wide	present, scattered granules	present, scattered granules
<i>Isoospora cagasebi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008	<i>C. flaveola</i>	Marambaia Island	Berto <i>et al.</i> (2010)	elongate ovoidal or ellipsoidal	17–20 (18.7)	10–12 (11.4)	1.5–1.7 (1.6)	knob-like	prominent	prominent	present, scattered granules	present, scattered granules

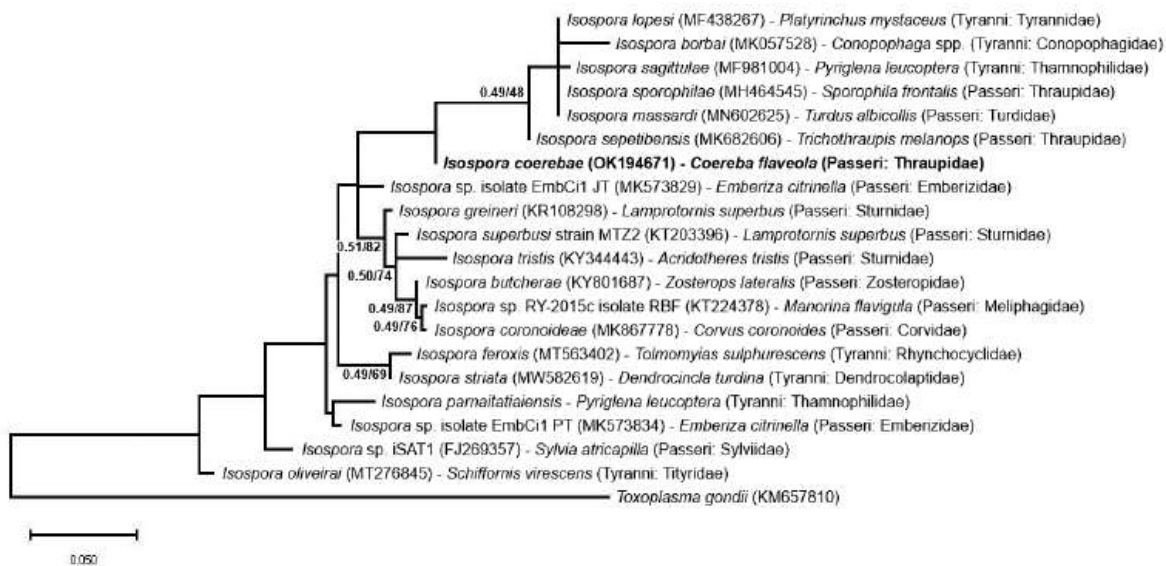


FIGURE 2. Maximum likelihood tree estimated from the COI1 gene sequences of coccidian species. Numbers at the nodes show posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis/bootstrap values derived from Maximum Likelihood analysis. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

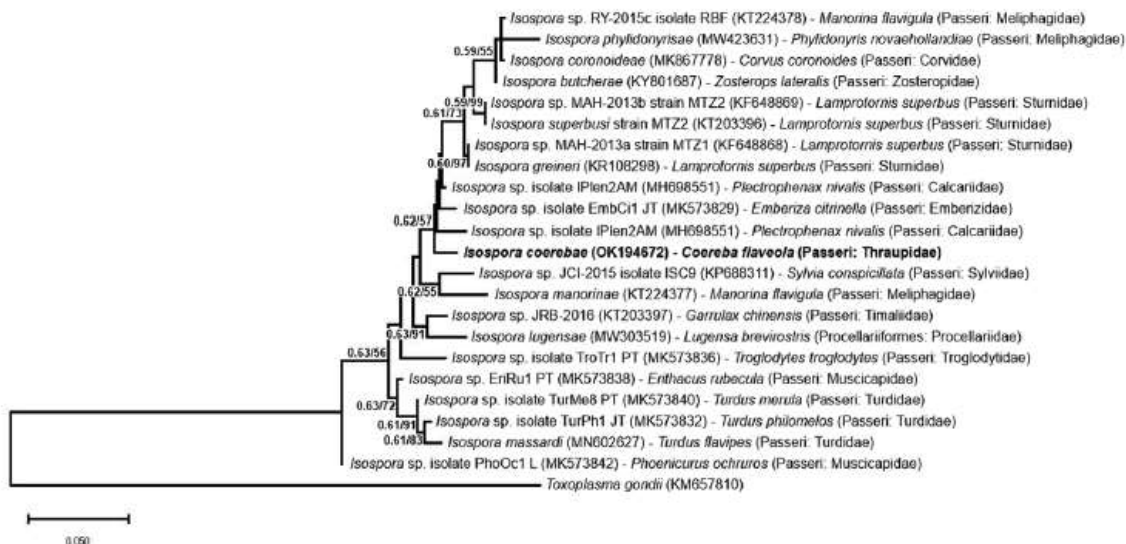


FIGURE 3. Maximum likelihood tree estimated from the COI2 gene sequences of coccidian species. Numbers at the nodes show posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis/bootstrap values derived from Maximum Likelihood analysis. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

Discussion

The molecular approach to the study of coccidia still has many inconsistencies, requiring more sequencing of different genes e genic regions, and in a larger number of species. The overwhelming majority of coccidian species described in the scientific literature were based on the morphological and morphometric study of oocysts. This is justified by the fact that molecular techniques are a relatively recent advent, whereas eimerid coccidians have been described since the 19th century (Duszynski & Wilber 1997; Tenter *et al.* 2002; Berto *et al.* 2014). Thus, many recent works show a molecular complementation, and consequently a phylogenetic analysis, of species already known to science, such as the contributions of Genovez-Oliveira *et al.* (2019); Genovez-Oliveira *et al.* (2020); Ortúzar-Fer-

reira *et al.* (2021) and Oliveira *et al.* (2021). Other works have even promoted taxonomic changes based on genetic information, such as the taxonomic rearrangement of *Cryptosporidium* (Barta & Thompson 2006).

According to Barta (2001) molecular tools should be useful, mainly to infer evolutionary relationships in protist parasites, considering that the morphological characteristics become limited in certain groups to distinguish species, even more for the understanding of evolutionary history. Adaptive irradiations and evolutionary convergences are phenomena that explain the diversity of living beings, but that can also become confusing or conflicting without a genetic approach (Wilson 1995). For this reason, molecular studies have been widely applied in recent decades, not as a substitute technique, but to complement the taxonomic and phylogenetic data of the species. In this sense, it is noteworthy that the morphology associated with the biological and ecological aspects of parasites and hosts continue to be elementary for any taxonomic and/or phylogenetic study. Molecular studies are, therefore, an exceptional complement to confirm or reject hypotheses, delineate more precisely the phylogeny of groups (monophylies, paraphylies, etc.), understand inherent evolutionary aspects (polymorphism and genetic variation within the same species) and support the description of new species (Hewitt *et al.* 1991, Godfray & Knapp 2004, Dolnik *et al.* 2009).

The genes commonly used in the sequencing of *Isospora* spp. are the ribosomal and mitochondrial genes, with 18S being one of the most widely used. While ribosomal genes are more conserved, mitochondrial genes accumulate more changes over time and are therefore less conserved. In this sense, mitochondrial genes allow for a better approach to species separation/identification and to delimit recent speciation events (Schrenzel *et al.* 2005; Dolnik *et al.* 2009; Ogedengbe *et al.* 2018). Among the mitochondrial genes sequenced for the study of *Isospora* spp., COI has been widely used, although recent work has sequenced other mitochondrial genes aiming at the complete mitochondrial genome (Ogedengbe *et al.* 2016; Hafeez *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017).

In the current work, amplification/sequencing of a genic region of the 18S has been attempted, but has not been successful; in contrast, two genic regions of the COI were amplified/sequenced. The genic region named here as COI1 is pioneer for *Isospora* spp. from passerines (Dolnik *et al.* 2019) and has been widely used in the studies with molecular identification of coccidia of passerine birds. However, this small region of ~250 bp (COI1) has been shown to be unsuitable for phylogenetic studies, as it has not generated clades associated with the morphology, biology and/or ecology of the species (Oliveira *et al.* 2021). In this sense, the current work also used primers that amplify a larger genic region of COI, with ~650 bp (COI2), which was designed by Genovez-Oliveira *et al.* (2020). Although there is a small overlap between the COI1 and COI2 genic regions, the longer COI2 sequence should generate better phylogenetic results, although the very small number of species sequenced for this genic region does not allow for further conclusions. Therefore, observing the phylogenetic tree for the COI2 genic region (Figure 3), it is observed that *I. coerebae* was close to *Isospora* spp. from passerines from outside the Neotropical region, which were extensively sequenced for mitochondrial genes or had the mitochondrial genome completed, with only *I. massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira and Lopes, 2014 sequenced from thrushes *Turdus* spp. in Brazil for this same genic region. On the other hand, in the phylogenetic tree for COI1 (Figure 2), there is a greater amount of sequences of *Isospora* spp. from neotropical birds, including from the same Thraupidae family, such as the black-goggled tanager, which its parasite *I. sepetibensis* was the closest to *I. coerebae* for the COI1 genic region. However, the phylogenetic tree for COI1 (Figure 2) is still inconclusive, since coccidian species with close ecological, biological and morphological characteristics were distant and/or sat in distinct clades.

The identification of *I. coerebae* in the RPPN of Porangaba reinforces the possibility of the dispersion of coccidians from Marambaia Island to the mainland. In the work of Rodrigues *et al.* (2017), a coccidian originally described from passerines of the Marambaia Island was also identified in passerines in the mainland. In fact, the island has a sand zone of around 40 km in extension (Marambaia Coastal Restinga) connected to the mainland, which probably allows the migration of birds from the mainland to the island, favoring the dispersal of their coccidia.

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. coerebae* is reported in the current work, documenting a new locality in the Brazilian Atlantic forest, the RPPN of Porangaba, Southeastern Brazil.

Acknowledgements

We are thankful to staff at the Private Natural Heritage Reserve Porangaba, mainly to the the owner Dr. Jürgen

Döbereiner (*in memoriam*) and the environmental manager Luiz Fernando Cardoso, that allowed us to carry out data collections at the RPPN and use some facilities during the expeditions, as well as the fundamental help of the naturalist photographer José Felipe Pereira during the collections. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). CNO-F has a scholarship from CNPq/UFRRJ (Grant/Award Number: PVBS2485-2021). LASA, JLG-O and MSO has a scholarships from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

References

- Barta, J.R. (2001) Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Veterinary Parasitology*, 101, 175–186.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00564-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00564-7)
- Barta, J.R. & Thompson, R.C.A. (2006) What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22 (10), 463–468.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.001>
- Berto, B.P., Flausino, W., Luz, H.R., Ferreira, I. & Lopes, C.W.G. (2010) *Isospora coerebae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Passeriformes: Coerebidae) in South America. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20 (1), 22–26.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000100005>
- Berto, B.P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W.L. & Lopes, C.W.G. (2011) Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
<https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto, B.P. & Lopes, C.W.G. (2013) Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: Ruiz, L. & Iglesias, F. (Eds.), *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, New York, pp. 47–66.
- Berto, B.P., McIntosh, D. & Lopes, C.W.G. (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23 (1), 1–15.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Chapman, H.D., Barta, J.R., Blake, D., Gruber, A., Jenkins, M., Smith, N.C., Suo, X. & Tomley, F.M. (2013) Uma revisão seletiva dos avanços na pesquisa da coccidiose. *Advances in Parasitology*, 93–171.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407705-8.00002-1>
- Dolnik, O.V., Palinauskas, V. & Bensch S. (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174.
<https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Duszynski, D.W. & Wilber, P. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83 (2), 333–336.
<https://doi.org/10.2307/3284470>
- Fayer, R. (1980) Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, 6, 75–103.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(80\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(80)90039-4)
- Genovez-Oliveira, J.L., Cardozo, S.V., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I. & Berto, B.P. (2019) Morphological and molecular identification of *Isospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoniinae) in South America. *Acta protozoologica*, 58, 17–23.
<https://doi.org/10.4467/16890027AP.19.007.10838>
- Genovez-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Thode-Filho, S., Cardozo, S.V., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I. & Berto, B.P. (2020) Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitology Internacional*, 75, 102040.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102040>
- Ghimire, T.R. (2010) Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin, 1903. *International Journal of Life Sciences*, 4, 26–47.
<https://doi.org/10.3126/ijls.v4i0.3285>
- Godfray, H.C.J. & Knapp, S. (2004) Introduction. Taxonomy for the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359 (1444), 559–569.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1457>
- Hafeez, M.A. & Barta, J.R. (2017) The complete mitochondrial genome sequences of two *Isospora* species (Eimeriidae, Eu-

- coccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing coccidiosis in superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (2), 895–896.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1407698>
- Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Joung, J.P.W. (1991) *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin and New York, 410 pp.
- Júnior, A.B., Silva, E.N., Fábio, J.D., Sesti, L. & Zuanaze, M.A.F. (2009) *Doença das aves. Segunda Edição*. FACTA—Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas-SP, 1577 pp.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Levine, N.D. (1985) *Veterinary Protozoology. 1^o Edition*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 414 pp.
- Ogedengbe, J.D., Hanner, R.H. & Barta, J.R. (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*, 41, 843–850.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>
- Ogedengbe, M.E., Brash, M. & Barta, J.R. (2016) The complete mitochondrial genome sequence of an *Isospora* sp. (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing systemic coccidiosis in domestic Canaries (*Serinus canaria* Linn.). *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (5), 3315–3317.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1018201>
- Ogedengbe, M.E., El-Sherry, S., Ogedengbe, J.D., Chapman, H.D. & Barta, J.R. (2018) Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). *International Journal for Parasitology*, 48, 59–69.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.008>
- Oliveira, M.S., Mello, E.R., Cardozo, S.V., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I., Berto, B.P. (2021) Distribution, redescription and molecular identification of *Isospora striata* McQuistion et. al 1997 (Eimeriidae) from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America. *Parasitology Research*, 120, 2585–2593.
<https://doi.org/10.1007/s00436-021-07140-9>
- Ortúzar-Ferreira, C.N., Mello, E.R., Melo, J.O., Oliveira, M.S., Thode-Filho, S., Cardozo, S.V., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I. & Berto, B.P. (2021) Redescription and the molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Systematic Parasitology*, 98, 333–341.
<https://doi.org/10.1007/s11230-021-09981-5>
- Rodrigues, M.B., de Pinho, I.F., da Silva, L.M., doBomfim Lopes, B., Luz, H.R., Ferreira, I., Lopes, C.W.G. & Berto, B.P. (2017) The ruby-crowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot, 1822 (Passeriformes: Thraupidae) as a new host for *Isospora ramphoceli* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2010 in Brazil. *Acta parasitologica*, 62 (2), 306–311.
<https://doi.org/10.1515/ap-2017-0038>
- Schrenzel, M.D., Maalouf, G.A., Gaffney, P.M., Tokarz, D., Keener, L.L., McClure, D., Griffey, S., McAloose, D. & Rideout, B.A. (2005) Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *The Journal of Parasitology*, 91 (3), 635–647.
<https://doi.org/10.1645/GE-3310>
- Sigrist, T. (2014) *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. Avis Brasilis, São Paulo, 608 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8), 1596–1599.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tenter, A., Barta, J.R., Beveridge, I., Duszynski, D.W., Mehlhorn, H., Morrison, D.A., Thompson, R.C.A. & Conrad, P. (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal of Parasitology*, 32, 505–616.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00021-8)
- Wilson, K.H. (1995) Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clinical Infectious Diseases*, 20 (Supplement 2), S117–S121.
https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement_2.S117
- Yang, R., Brice, B., Elloit, A., Lee, E. & Ryan, U. (2014) Morphological and molecular characterization of *Eimeria paludosa* coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) in a dusky moorhen (*Gallinula tenebrosa*, Gould, 1846) in Australia. *Experimental Parasitology*, 147, 16–22.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.10.010>
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A. & Ryan, U. (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>
- Yang, R., Brice, B., Oskam, C., Zhang, Y., Brigg, F., Berryman, D. & Ryan, U. (2017) Characterization of two complete *Isospora* mitochondrial genomes from passerine birds: *Isospora serinuse* in a domestic canary and *Isospora manorinae* in a yellow-throated miner. *Veterinary Parasitology*, 237, 137–142.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.027>



Isospora spp. (Eimeriidae) from green-winged saltators *Saltator similis* d’Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Thraupidae) from captivity near the Conservation Unit of the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil

Carla Maronezi · Mariana de Souza Oliveira · Jhon Lennon Genovez-Oliveira · Ericson Ramos de Mello · Patrícia Barizon Cepeda · Águida Aparecida de Oliveira · Viviane Moreira de Lima · Bruno Pereira Berto

Received: 1 November 2021 / Accepted: 14 January 2022 / Published online: 3 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract The present study identifies three *Isospora* spp. recorded from faecal samples of green-winged saltators *Saltator similis* d’Orbigny & Lafresnaye kept in captivity in the surroundings of the Itatiaia National Park, which is a Conservation Unit with a high degree of vulnerability located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro and Minas Gerais. *Isospora saltatori* Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008, *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008 and *Isospora similisi* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino & Lopes, 2013 were compatible in all characteristic features with their respective original descriptions, despite some

divergences that are discussed in this study. In addition to the preliminary morphological identification, this study provided a preliminary genotypic identification of these three *Isospora* spp. via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene, which was suitable for the genotypic differentiation of these three coccidians, but was inconclusive in the phylogenetic analysis. Finally, this study discusses the environmental risks of these coccidians in captivity of green-winged saltators in the surroundings of the Itatiaia National Park.

C. Maronezi
Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

M. S. Oliveira · J. L. Genovez-Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

E. R. de Mello
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

P. B. Cepeda
Centro Universitário de Barra Mansa, Rua Vereador Pinho de Carvalho 267, Barra Mansa, Rio de Janeiro 27330-550, Brazil

Á. A. de Oliveira
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil

V. M. de Lima · B. P. Berto (✉)
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brazil
e-mail: bertobp@ufrj.br

Introduction

The Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia) is located in Serra da Mantiqueira, covering the territory of the Municipalities of Itatiaia, Resende, Itamonte and Bocaina de Minas in the States of Rio de Janeiro and Minas Gerais, with altitudes ranging between 540m and 2,791m at Pico das Agulhas Negras, the highest point of the State of Rio de Janeiro and 5th highest in Brazil. This was the first National Park in Brazil, constituted on June 14, 1937, as an Integral Protection Conservation Unit (ICMBIO, 2016).

The green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye are passerines of the family Thraupidae and subfamily Saltatorinae, which are part of the bird community that occurs around and within the Itatiaia National Park (Maia-Gouvêa et al., 2005; BirdLife International, 2021). This species is one of the most appreciated wild birds in Brazil, especially for its vocalization, being considered one of the favorite passerines for breeding in captivity, due to a cultural context established by Brazilians, who keep wild songbirds in cages (Sick, 1997). In this sense, green-winged saltators are classified among the main passerines seized from the illegal wildlife trafficking (biopiracy), by environmental inspection (Destro et al., 2012).

The confinement in which the passerines are submitted in the biopiracy cause constant stress that favors the occurrence of illnesses (Maia-Gouvêa et al., 2005; Berto & Lopes, 2020). Among the diseases that affect passerines in captivity are nutritional disorders, viral, bacterial, fungal and parasitic diseases (Coelho et al., 2012); however, parasitic diseases are the most frequent, which can range from subclinical to deadly (Freitas, 2002). Among the parasites of importance in passerines are the coccidians, which are intestinal protozoans that can cause reduced weight gain, affect the intestinal reabsorption of nutrients, reduce the fertility of birds and even lead to death, being frequently observed in faecal samples (Oliveira, 2017).

In this context, the present study identifies three *Isospora* spp. recorded from *S. similis*, from faecal samples from green-winged saltators kept in captivity in the surroundings of the Itatiaia National Park, recording new localities and highlighting the possibility of occasional transmissions or even epizootics in

populations of *S. similis* and other free-living Saltatorinae of the Itatiaia National Park. Additionally, this study provides a preliminary genotypic identification of these three *Isospora* spp. via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene.

Materials and methods

Sample collection

Faecal samples were collected from eight specimens of *S. similis* which were kept alone in cages from five different breeders of green-winged saltators located near the territory of the Itatiaia National Park (22°30'S, 44°34'W). The bottoms of the cages were previously covered with absorbent paper and faeces collected immediately after defecation. The collected faeces were then placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v).

Morphological analyses

Samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 days or until ~70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using Corel DRAW® and Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Version 2020, Corel Corporation, Canada). All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses. Linear regression was used to determine the distribution of oöcysts using methods proposed by Norton & Joyner (1981) and subsequently modified by Berto et al. (2014). The graphs and coefficient of regression line were obtained using the software Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, Washington).

Molecular analyses

An individual oöcyst from each faecal sample of *S. similis* was isolated from serial dilutions of the oöcysts in drops on a microscope slide using a sterile micropipette. This isolated oöcyst was resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the purified oöcysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oöcyst, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0.25 µL of each Primer (0.2 µM), 9 µL of Nuclease Free Water, 3 µL of DNA (for primary reaction) or 3 µL primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 47°C for 45 s, and 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses

All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for coccidian species at the COI sequences aligned with additional isolates from GenBank.

Distance analyses and phylogenies were conducted using MEGA X (Kumar et al. 2018). Briefly, Sanger sequencing chromatogram files were imported into MEGA X and the nucleotide sequences of each genic region was curated, analysed, and aligned with reference sequences from GenBank using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Maximum likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) trees were constructed and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA X. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

Eight *S. similis* were examined and seven of them (88%) were passing coccidia. Three distinct morphotypes were observed and morphologically identified as *Isospora saltatori* Berto et al., 2008, *Isospora trincaferri* Berto et al., 2008 and *Isospora similisi* Coelho et al., 2013 (Berto et al. 2008). The morphologies of these oöcysts are specifically reported below.

Eimeriidae Minchin, 1903

Isospora Schneider, 1881

Isospora saltatori Berto et al., 2008

Host: *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Aves: Passeriformes: Thraupidae: Saltatorinae) green-winged saltator.

Locality: Five captive breeding colonies of green-winged saltators in the surroundings of the Itatiaia National Park (22°30'S, 44°34'W), Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 116/2021. Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown; oöcysts recovered from faeces.

Prevalence: 75% (6/8).

Representative DNA sequence: Representative COI sequences were deposited in the GenBank database under the accession number OK631535.

Morphology (Fig. 1A-E)

Sporulated oöcyst

Oöcysts (n = 56) subspheroidal, 16–21 × 16–20 (18.7 × 18.0); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1 (1.04). Wall bi-layered, 1.1–1.7 (1.4) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle, oöcyst residuum and polar granule absent.

Sporocyst and sporozoites

Sporocysts (n = 56) 2, ovoidal to ellipsoidal, 12–15 × 7–10 (13.6 × 8.5); L/W ratio 1.4–1.8 (1.61). Stieda body present, flattened to half-moon-shaped, 0.4–0.6 × 1.2–1.6 (0.5 × 1.4); sub-Stieda body present, rounded, 0.8–1.2 × 1.6–1.8 (1.0 × 1.7); parastieda body absent; sporocyst residuum present, composed of granules of different sizes slightly clustered, but also scattered among sporozoites. Sporozoites 4, with a robust posterior refractile body, but nucleus is indiscernible.

Isospora trincaferri Berto et al., 2008

Host: *Saltator similis* d’Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Aves: Passeriformes: Thraupidae: Saltatorinae) green-winged saltator.

Locality: Five captive breeding colonies of green-winged saltators in the surroundings of the Itatiaia National Park (22°30’S, 44°34’W), Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs are deposited and available (<http://rl.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de

Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 117/2021. Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown; oöcysts recovered from faeces.

Prevalence: 38% (3/8).

Representative DNA sequence: Representative COI sequences were deposited in the GenBank database under the accession number OK631536.

Morphology (Fig. 2A–E)

Sporulated oöcyst

Oöcysts (n = 44) subspheroidal to ovoidal, 20–26 × 19–24 (21.4 × 19.8); length/width (L/W) ratio 1.0–1.2 (1.08). Wall bi-layered, 1.2–1.8 (1.6) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle inconspicuous, being slightly observed in only a few oöcysts. Oöcyst residuum absent, but 1–2 (usually only 1) polar granules are present.

Sporocyst and sporozoites

Sporocysts (n = 44) 2, ovoidal to ellipsoidal, 14–19 × 8–12 (15.6 × 9.7); L/W ratio 1.4–1.9 (1.61). Stieda body present, knob-like to bubble-shaped, 1.1–1.4 × 2.0–2.8 (1.3 × 2.3); sub-Stieda body present, rounded to trapezoidal, 1.8–2.5 × 3.0–3.6 (2.1 × 3.4); parastieda body absent; sporocyst residuum present, usually as a distinctly subspheroidal to ellipsoidal body consisting of numerous small granules that appear to be membrane-bounded, 5.3–7.4 × 4.7–5.3

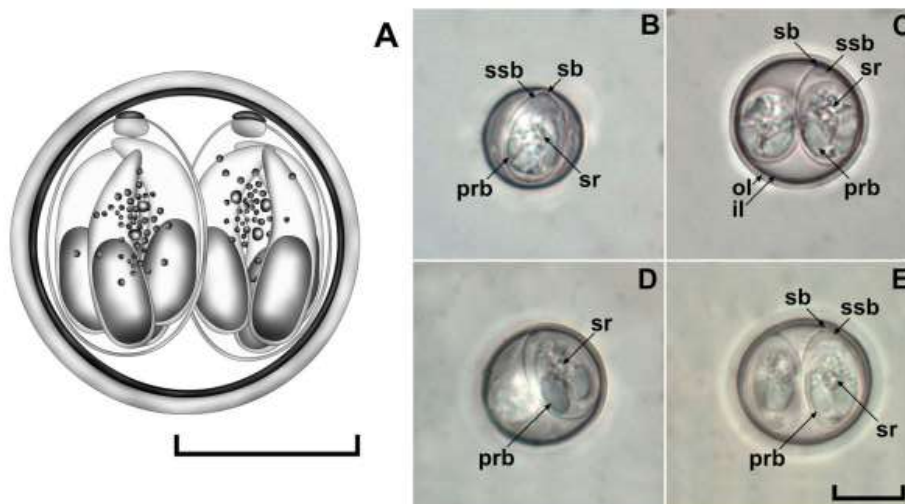


Fig. 1 Composite line drawing (A) and photomicrographs (B–E) of sporulated oöcysts of *Isospora saltatori* from green-winged saltators *Saltator similis*. Note the inner (il) and outer (ol) layers of the oöcyst wall; Stieda (sb) and sub-Stieda bodies (ssb); sporocyst residuum (sr); and posterior refractile body (prb). Scale-bar: 10 µm

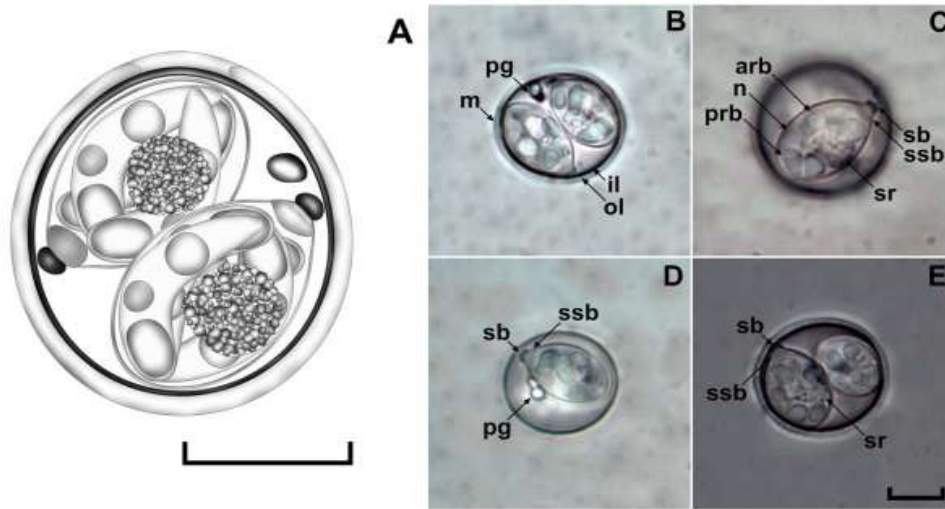


Fig. 2 Composite line drawing (A) and photomicrographs (B–E) of sporulated oocysts of *Isospora trincaferri* from green-winged saltators *Saltator similis*. Note the inner (il) and outer (ol) layers of the oocyst wall; micropyle (m); nucleus (n); polar granule (pg); Stieda (sb) and sub-Stieda bodies (ssb); sporocyst residuum (sr); anterior (arb) and posterior (prb) refractile bodies. Scale-bar: 10 µm

(5.9 × 5.0). Sporozoites 4, vermiform, with posterior and anterior refractile bodies and centrally located nucleus.

Isospora similis Coelho et al., 2013

Host: *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Aves: Passeriformes: Thraupidae: Saltatorinae) green-winged saltator.

Locality: Five captive breeding colonies of green-winged saltators in the surroundings of the Itatiaia National Park (22°30'S, 44°34'W), Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number 118/2021. Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown; oocysts recovered from faeces.

Prevalence: 38% (3/8).

Representative DNA sequence: Representative COI sequences were deposited in the GenBank database under the accession number OK631537.

Morphology (Fig. 3A–E)

Sporulated oocyst

Oocysts (n = 48) subspheroidal, 20–26 × 19–24 (23.3 × 22.0); length/width (L/W) ratio 1.0–1.1 (1.06).

Wall bi-layered, 1.4–1.8 (1.7) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle and oocyst residuum are absent, but splinter-like or comma-like polar granules are present.

Sporocyst and sporozoites

Sporocysts (n = 48) 2, ovoidal to slightly piriform, 15–18 × 10–12 (16.6 × 11.0); L/W ratio 1.4–1.7 (1.51). Stieda body present, half-moon-shaped to knob-like, 0.7–1.6 × 2.1–2.7 (1.0 × 2.4); sub-Stieda body present, rounded to trapezoidal, 2.3–3.4 × 3.3–4.8 (2.7 × 4.1), infrequently with density variations resembling a compartmentalized substieda; parastieda body absent; sporocyst residuum present, composed of spherules of different sizes. Sporozoites 4, vermiform, with posterior refractile body and centrally located nucleus.

Phylogenetic analysis

DNA amplification of the oocyst of *I. saltatori*, *I. trincaferri* and *I. similis* showed clear bands of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 31 sequences for avian *Isospora* spp. available on GenBank (Fig. 4). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. The three *Isospora* spp. of the present study had different COI sequences from each other: *Isospora saltatori* was 91% similar with *I. trincaferri* and 93% with *I. similis*; and *I. trincaferri* was 97% similar to *I. similis*. These *Isospora* spp.

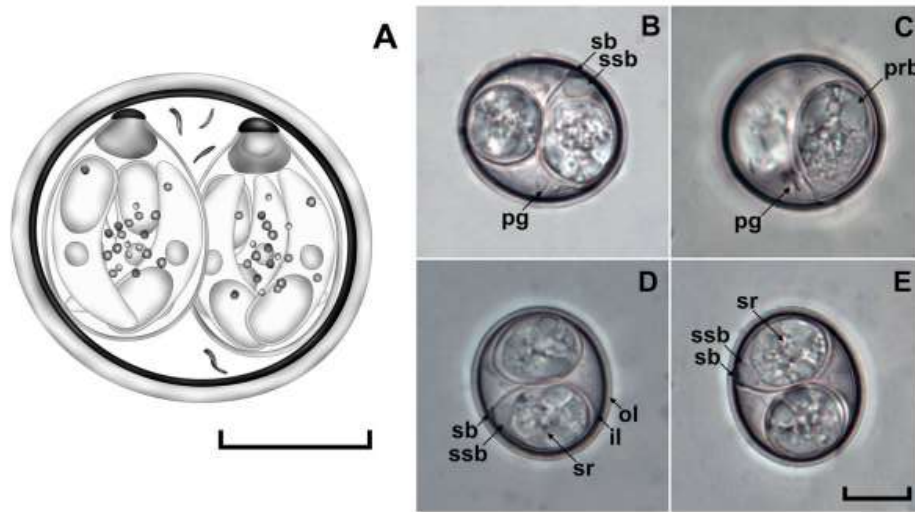


Fig. 3 Composite line drawing (A) and photomicrographs (B–E) of sporulated oocysts of *Isospora similis* from green-winged saltators *Saltator similis*. Note the inner (il) and outer (ol) layers of the oocyst wall; polar granules (pg); Stieda (sb) and sub-Stieda bodies (ssb); sporocyst residuum (sr); posterior refractile body (prb). Scale-bar: 10 μ m

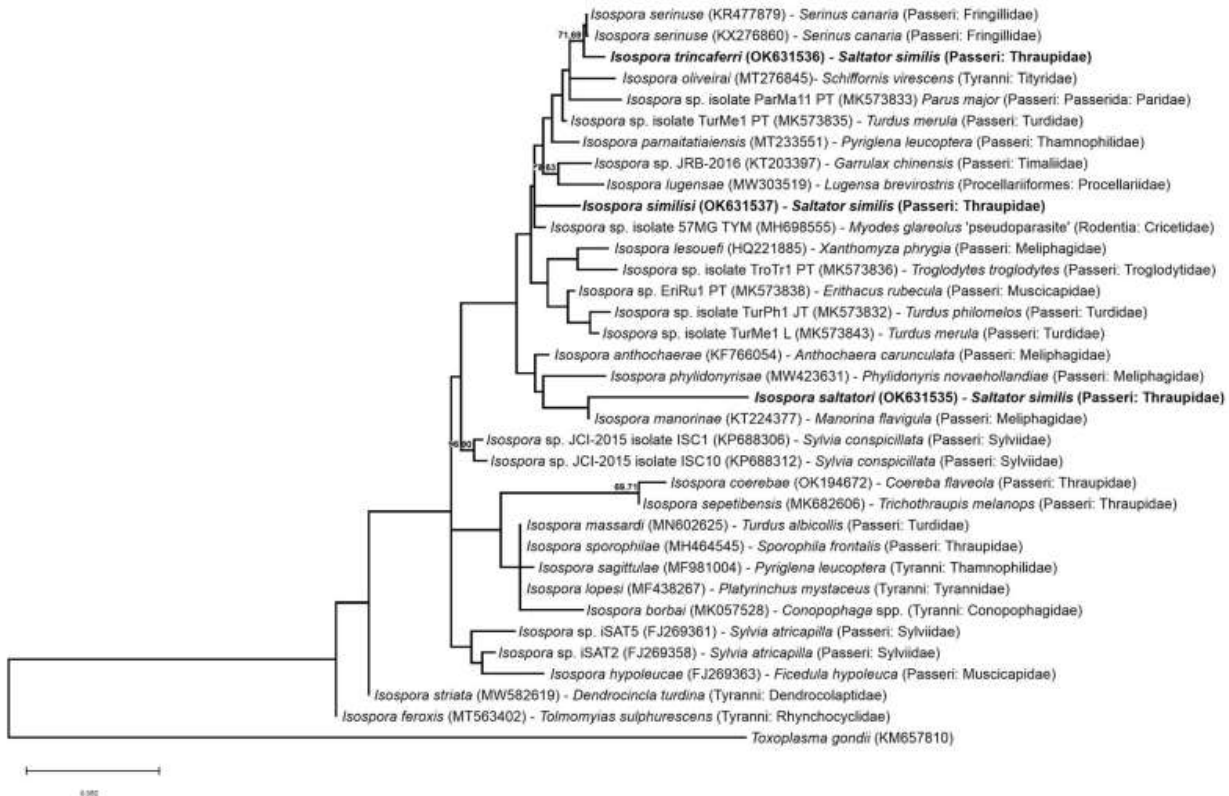


Fig. 4 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1,000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

from *S. similis* have been separated from each other in the phylogenetic analysis, into clades containing *Isoospora* spp. from Neotropical passerines, but also from passerines of the Old World and Oceania. *Isoospora trincaferri* and *I. similis* have the highest similarities of 97% with *Isoospora serinuse* Yang, Brice, Elliot et Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (Linnaeus); while *I. saltatori* had the highest similarity of 94% with *Isoospora manorinae* Yang, Brice, Jian & Ryan, 2016 from the yellow-throated miner *Manorina flavigula* (Gould).

Discussion

The three *Isoospora* spp. reported in the present study were compatible in all characteristic features with their respective original descriptions, despite the large morphometric range observed in the oöcysts of the samples in this study, as well as related to morphometry from the original and/or previous descriptions (Table 1).

Isoospora saltatori had the smallest morphometric range and the greatest similarity with previous reports. It is just important to emphasize that, in Barreto et al. (2020), oöcysts morphologically identifiable as *I. saltatori*, obtained from green-winged saltators from a rehabilitation center in Southeastern Brazil, were described as *Isoospora ferri* Barreto, Vilela, Hourri, Lara, Torres, Silva, Castro-Filho, Costa & Martins, 2020; however, the measurements and photomicrographs presented are fully compatible with *I. saltatori*, mainly due to the robust posterior refractile bodies of the sporozoites, which are typical of the species. Furthermore, these authors did not detail the differences that would justify a new species and did not present a line drawing.

Isoospora trincaferri is the species with the most reports since its original description, including more than one host: The buff-throated saltator *Saltator maximus* (Statius Muller). However, even before the original description of this species, its oöcysts had already been observed, once that the report of *Isoospora vanriperorum* (Levine, 1982) by Lopes et al. (2007) is indicated in this study as a misidentification. The photomicrograph and line drawing presented in Lopes et al. (2007) are morphologically compatible with *I. trincaferri* and, mainly, the identification of *I. vanriperorum* from *S. similis* in Brazil is quite unlikely for

two reasons: (1) *Isoospora vanriperorum* was described from northern cardinals *Cardinalis cardinalis* (Linnaeus) in North America, therefore this coccidian is recorded in the host family Cardinalidae, which is distinct from the family of saltators that are Thraupidae (Saltatorinae) (note that *S. similis* was classified as Cardinalidae in 2007); and (2) *C. cardinalis* has a geographic distribution restricted to North America in contrast to *Saltator* spp. that are strictly Neotropical, therefore transmissions from *C. cardinalis* to *S. similis* are unlikely, even considering introductions by illegal trafficking or for legalized commercial breeding.

The morphometry of *I. trincaferri* had a wide range, not only observing the oöcysts of the samples in this study, but also in relation to the measurements of the other studies (Table 1). This wide range of measurements must be a factor inherent to the coccidian species, but it may also result from environmental factors associated with stress, immunosuppression, etc. (Berto & Lopes, 2020). In fact, most reports of coccidians from *S. similis* were made from captive birds and/or birds recently recovered from illegal trafficking, therefore birds subjected to environmental factors that are known to influence the morphology of coccidian oöcysts (Berto & Lopes, 2020). It is also noteworthy that certain antibiotic and/or coccidiostatic drugs frequently used by bird breeders interfere in the sporogony process, resulting in the formation of morphologically and morphometrically altered and/or mutant oöcysts (Li et al. 2010). In this context, Barreto et al. (2020) misidentified *I. trincaferri* and described a new species, *Isoospora beagai* Barreto, Vilela, Hourri, Lara, Torres, Silva, Castro-Filho, Costa & Martins, 2020, from potentially altered oöcysts, but which are identifiable as *I. trincaferri* by the photomicrographs presented. Among these photomicrographs a mutant oöcyst with only one sporocyst is observed, which is a mutation commonly associated with birds treated with certain drugs and which may also have been the cause of the larger measurements of oöcysts by Barreto et al. (2020) (Table 1).

The oöcysts of *I. similis* identified in the samples in this study had all the characteristic features of the original description by Coelho et al. (2013), which are quite typical, especially in relation to splinter-like or comma-like polar granules. However, they were smaller than those in the original description, confirming the statements by Berto & Lopes (2020), that the more stressed/immunosuppressed the host birds

Table 1 Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from saltators (Passeriformes: Thraupidae: Saltatorinae)

Species	Host	References	Oöcyst					
			Shape	Size (μm)	Shape index	Polar granule	Wall	Micropyle
<i>Isoospora pityli</i> McQuiston, Capparella, 1992	<i>Saltator grossus</i> (Linnaeus)	McQuiston & Capparella (1992)	subspheroidal	20–21 \times 17–20 (20.1 \times 18.8)	1.0–1.2 (1.07)	absent	smooth, (1.5)	absent
<i>Isoospora formarum</i> McQuiston, Capparella, 1992	<i>Saltator grossus</i> (Linnaeus)	McQuiston & Capparella (1992)	subspheroidal	21–27 \times 20–25 (24.6 \times 23.5)	1.0–1.1 (1.05)	absent	smooth, (1.5)	absent
<i>Isoospora saltatori</i> Berto et al., 2008	<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye	Berto et al. (2008)	subspheroidal	17–20 \times 16–20 (18.3 \times 17.9)	1.0–1.1 (1.0)	absent	smooth, 1.0–1.2 (1.1)	absent
	<i>S. similis</i>	Barreto et al. (2020) ¹	subspheroidal	16–22 \times 15–22 (20 \times 18)	1.0–1.2 (1.0)	absent	smooth, (1.0)	absent
	<i>S. similis</i>	present study	subspheroidal	16–21 \times 16–20 (18.7 \times 18.0)	1.0–1.1 (1.04)	absent	smooth, 1.1–1.7 (1.4)	absent
<i>Isoospora trincaferri</i> Berto et al., 2008	<i>S. similis</i>	Lopes et al. (2007) ²	subspheroidal	19–26 \times 18–26 (23.1 \times 22.4)	(1.04)	present, 1	smooth	absent
	<i>S. similis</i>	Berto et al. (2008)	subspheroidal to ellipsoidal	24–29 \times 22–25 (26.2 \times 23.6)	1.0–1.2 (1.1)	present, 1	smooth, 1.0–1.3 (1.2)	absent
	<i>Saltator maximus</i> Müller	Lopes et al. (2013)	subspheroidal to ellipsoidal	24–27 \times 23–26 (25.0 \times 24.0)	1.0–1.1 (1.04)	present, 1–2	smooth, (1.2)	absent
	<i>S. similis</i>	Barreto et al. (2020) ³	ovoidal	17–32 \times 16–29 (28.0 \times 25.0)	1.0–1.5 (1.1)	present	smooth, (1.0)	absent
	<i>S. similis</i>	present study	subspheroidal to ovoidal	20–26 \times 19–24 (21.4 \times 19.8)	1.0–1.2 (1.08)	present, 1–2 (usually only 1)	smooth, 1.2–1.8 (1.6)	inconspicuous
	<i>S. similis</i>	present study	subspheroidal	20–26 \times 19–24 (23.3 \times 22.0)	1.0–1.1 (1.06)	present, splinter- like or comma- like granules	smooth, 1.4–1.8 (1.7)	absent
<i>Isoospora similisi</i> Coelho et al., 2013	<i>S. similis</i>	Coelho et al. (2013)	subspheroidal	26–29 \times 24–28 (27.5 \times 25.9)	1.0–1.1 (1.1)	present, splinter- like or comma- like granules	smooth, 1.1–1.3 (1.2)	absent
	<i>S. similis</i>	present study	subspheroidal	20–26 \times 19–24 (23.3 \times 22.0)	1.0–1.1 (1.06)	present, splinter- like or comma- like granules	smooth, 1.4–1.8 (1.7)	absent

Table 1 continued

Species	Host	Reference	Sporocyst					
			Shape	Size (µm)	Shape index	Stieda body	Sub-Stieda body	Sporocyst residuum
<i>Isospora pityli</i> McQuiston, Capparella, 1992	<i>Saltator grossus</i> (Linnaeus)	McQuiston & Capparella (1992)	ovoidal	12–17 × 8–11 (14.7 × 9.4)	1.3–1.7 (1.57)	small, nipplelike	absent	amorphous cluster of granules, 4.0–5.0
<i>Isospora formarum</i> McQuiston, Capparella, 1992	<i>Saltator grossus</i> (Linnaeus)	McQuiston & Capparella (1992)	ovoidal	14–17 × 10–13 (15.7 × 11.3)	1.2–1.5 (1.4)	small, nipplelike	triangular-shaped or large conical, with irregular lower edge	large, nearly spheroid, com- posed of fine, uniform granules, (7,0)
<i>Isospora saltatori</i> Berto et al., 2008	<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye	Berto et al. (2008)	ovoidal	12–15 × 8–10 (13.4 × 8.9)	1.4–1.7 (1.5)	small and flattened, (0.5 × 1.5)	small, (0.7 × 1.8)	mass of granules
	<i>S. similis</i>	Barreto et al. (2020) ¹	ovoidal	12–20 × 7–11 (14 × 8)	1.3–2.5 (1.6)	flattened, (1.0 × 2.0)	prominent, (2.0 × 3.0)	diffuse
	<i>S. similis</i>	present study	ovoidal to ellipsoidal	12–15 × 7–10 (13.6 × 8.5)	1.4–1.8 (1.61)	flattened to half-moon- shaped, 0.4–0.6 × 1.2–1.6 (0.5 × 1.4)	rounded, 0.8–1.2 × 1.6–1.8 (1.0 × 1.7)	granules slightly clustered and scattered
<i>Isospora trincaferri</i> Berto et al., 2008	<i>S. similis</i>	Lopes et al. (2007) ²	ovoidal	14–20 × 8–13 (16.3 × 10.8)	(1.53)	prominent	barely discernible	centered and granulated
	<i>S. similis</i>	Berto et al. (2008)	ovoidal	17–18 × 10–13 (17.5 × 11.5)	1.3–1.6 (1.5)	bubble- shaped, (1.7 × 2.7)	large and prominent, (2.8 × 4.2)	scattered granules
	<i>Saltator maximus</i> Müller	Lopes et al. (2013)	ovoidal	17–20 × 10–12 (18.4 × 11.4)	1.6–1.7 (1.62)	bubble- shaped, (1.5 × 2.5)	large and rounded, (2.5 × 3.5)	scattered or clustered granules
	<i>S. similis</i>	Barreto et al. (2020) ³	ovoidal	12–23 × 9–15 (18.0 × 11.0)	1.2–2.2 (1.5)	prominent club- shaped, (2.0 × 3.0)	not reported	compact
	<i>S. similis</i>	present study	ovoidal to ellipsoidal	14–19 × 8–12 (15.6 × 9.7)	1.4–1.9 (1.61)	knob-like to bubble- shaped, 1.1–1.4 × 2.0–2.8 (1.3 × 2.3)	rounded to trapezoidal, 1.8–2.5 × 3.0–3.6 (2.1 × 3.4)	small granules membrane- bounded, 5.3–7.4 × 4.7–5.3 (5.9 × 5.0)

Table 1 continued

Species	Host	Reference	Sporocyst					
			Shape	Size (µm)	Shape index	Stieda body	Sub-Stieda body	Sporocyst residuum
<i>Isoospora similisi</i> Coelho et al., 2013	<i>S. similis</i>	Coelho et al. (2013)	ellipsoidal or slightly ovoidal	15–19 × 11–13 (17.4 × 12.2)	1.2–1.7 (1.4)	knob-like, (1.4 × 2.6)	large, (2.6 × 4.5)	granules of different sizes
	<i>S. similis</i>	present study	ovoidal to slightly piriform	15–18 × 10–12 (16.6 × 11.0)	1.4–1.7 (1.51)	half-moon-shaped to knob-like, 0.7–1.6 × 2.1–2.7 (1.0 × 2.4)	rounded to trapezoidal, sometimes heterogeneous, 2.3–3.4 × 3.3–4.8 (2.7 × 4.1)	spherules of different sizes

¹Originally identified as *Isoospora ferri* Barreto, Vilela, Hourí, Lara, Torres, Silva, Castro-Filho, Costa & Martins, 2020.

²Originally identified as *Isoospora vanriperorum* (Levine, 1982).

³Originally identified as *Isoospora beagai* Barreto, Vilela, Hourí, Lara, Torres, Silva, Castro-Filho, Costa & Martins, 2020

are, there is a tendency for their coccidian oöcysts to be shed in greater number and size. Whereas the oöcysts in the description by Coelho et al. (2013) were from green-winged saltators recently recovered from illegal trafficking, it is concluded that they should be more stressed/immunosuppressed shedding more and larger oöcysts compared to those obtained from breeders in this study, which despite being in captivity, were better treated than those subjected to illegal trafficking.

From another point of view, despite the wide ranges of measurements of oöcysts of the three species identified in this study, these coccidians were uniform in the distribution of widths on lengths of their oöcysts, which were evaluated by linear regression obtaining values of R^2 (coefficient of determination) greater than 0.5 (Figure 5) (Berto et al. 2014). Additionally, it can be implied that the oöcysts and sporocysts of *I. trincaferri* and *I. similisi* are not differentiated by their sizes, as there is proximity of their regression lines, unlike the oöcysts and sporocysts of *I. saltatori* which are smaller, therefore their regression lines are below and to the left in the graph in Figure 5. The less sloping regression line of *I. trincaferri* also can be highlighted, which matches its ovoidal oöcysts, that is, longer than those of *I. similisi* and *I. saltatori* (Figure 5) (Berto et al. 2014).

Some characteristic features were updated and/or detailed in the reports of *I. trincaferri* and *I. similisi* in the present study, which were not mentioned in

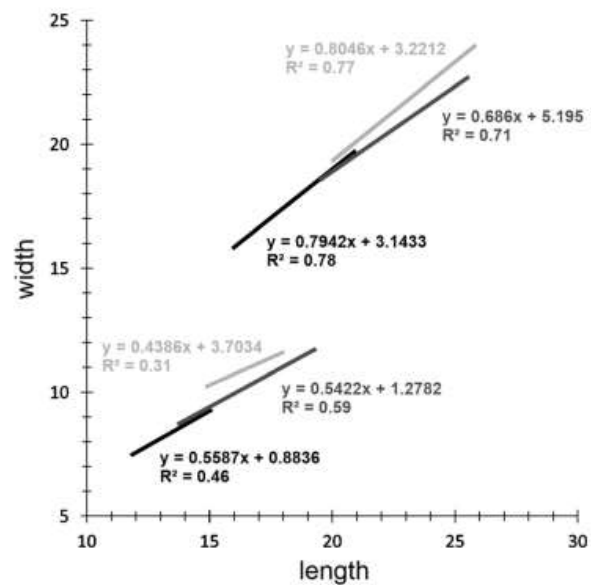


Fig. 5 Comparative linear regressions of oöcysts (above) and sporocysts (below) of *Isoospora saltatori* (black), *Isoospora trincaferri* (dark gray) and *Isoospora similisi* (light gray) recovered from green-winged saltators *Saltator similis*.

previous studies due to observation failure or the lower number of observed oöcysts. It is noteworthy in the description of *I. trincaferri* the inclusion of an inconspicuous micropyle in some oöcysts and, in *I. similisi*, the observation of oöcysts with heterogeneous sub-Stieda bodies, that is, with different densities, resembling a compartmentalized sub-Stieda body. These inclusions are not essential for the identification

of these species, but they provide further details to their descriptions.

Isospora pityli McQuiston, Capparella, 1992 and *Isospora formarum* McQuiston, Capparella, 1992 have been described from slate-colored grosbeaks *Saltator grossus* (Linnaeus) on the east (cis-Andean) and west (trans-Andean) slopes of the Andes Mountains in Ecuador (McQuiston & Capparella, 1992). *Saltator similis* is not sympatric with *S. grossus*, making direct transmission of coccidians between these saltators unlikely, although the buff-throated saltator *S. maximus* has a wide geographic distribution in central Brazil and is sympatric with both *S. similis* and *S. grossus* (BirdLife International, 2021). This information is relevant, as *I. pityli* is similar to *I. saltatori*, just as *I. formarum* is similar to *I. similis*, and since the recent classification of Passeriformes reclassified *Pitylus grossus* (Linnaeus) (synonymy of *S. grossus* and previously classified in the family Emberizidae) in the genus *Saltator* and the subfamily Saltatorinae in the Thraupidae family has been established (Pacheco et al., 2021), these coccidian species of *S. grossus* were approximated to the coccidians of *S. similis*. With the exception of a few characteristic features, such as the splinter-like or comma-like polar granules of *I. similis* and the presence of sub-Stieda in *I. saltatori*, these species are morphologically and morphometrically compatible (Table 1). Thus, *I. saltatori* would become a junior synonym of *I. pityli* and *I. similis* a junior synonym of *I. formarum*. However, due to the allopatry between *S. similis* and *S. grossus*, these small morphological differences of the oöcysts and the fact that *I. saltatori* and *I. similis* have been identified only from *S. similis* so far, make the establishment of *I. saltatori* and *I. similis* as synonyms of *I. pityli* and *I. formarum* early and imprudent, at least with the data currently available.

The sequencing of the three *Isospora* spp. of the present study was suitable for the identification and molecular differentiation between them and the other *Isospora* spp. previously sequenced and deposited in the GenBank for this same genic region of the COI. The phylogenetic analysis, in turn, was not conclusive in determining monophyletic groups associated with hosts, geographic regions, morphological types, etc. as already observed by other authors (Oliveira et al. 2021). In fact, this ~250bp genic region of the COI gene is easily amplified from individual oöcysts and,

therefore, frequently used since the pioneering study by Dolnik et al. (2009), in addition to being indicated as the gene of the 'Barcode of Life' (Ogedengbe et al. 2011); however, the more *Isospora* spp. sequences for this genic region are deposited, the more their inappropriateness for phylogenetic conclusions is observed. Anyway, the phylogenetic analysis for these *Isospora* spp. is presented in this study to support these conclusions and, possibly, guide the future choice of other genic regions for the phylogenetic study of *Isospora* spp. of passerines.

Breeding green-winged saltators near the conservation unit of the Itatiaia National Park is a dangerous activity from an environmental point of view, as their coccidian parasites can be transmitted to *S. similis* and other susceptible *Saltator* spp. in the park. Transmission to other *Saltator* spp. it would be possible according to the report of *I. trincasferri* from *S. maximus*; furthermore, due to the widely accepted concept of host family-level specificity (Duszynski & Wilber, 1997; Berto et al. 2011), other thraupids, in addition to saltators, could also be susceptible. Additionally, as in captive birds the density of coccidians is potentially higher than in birds in the wild, subsequent transmissions of a greater number of oöcysts from captivity to the wild could increase the component population of oöcysts in certain localities and, consequently, increase the suprapopulation of coccidians in the Itatiaia National Park, which can lead to epizootics of coccidiosis depending on the species and immunity of the passerines (Bush et al. 1997; Berto & Lopes, 2020).

In this context, there are 18 *Saltator* spp., all Neotropical, of which 9 occur in Brazil (BirdLife International, 2021). In the Itatiaia National Park, three species are observed: (1) *Saltator similis*; (2) the thick-billed saltator *Saltator maxillosus* (Cabanis); and (3) the black-throated grosbeak *Saltator fuliginosus* (Daudin) (Ribenoim, 2017). Of these three species, *S. similis* is most commonly observed in the upper part of the Itatiaia National Park, but also in the lower part and in the surroundings of the park; therefore, it is the most susceptible species to approach and become infected in captivity around the Itatiaia National Park (Maia-Gouvêa et al., 2005; Ribenoim, 2017). *Saltator fuliginosus* and *S. maxillosus* are, respectively, not often seen and difficult to spot in the PNI (Maia-Gouvêa et al., 2005; Ribenoim, 2017). In this sense, *S. fuliginosus* and *S. maxillosus*, which are

more restricted in the Itatiaia National Park, have high forest dependence (BirdLife International, 2021) and are potentially susceptible to *Isospora* spp. of *S. similis*, are likely the most threatened species to this possible transmission and dispersion of coccidians of *S. similis* from captivity to the wild environment of the Itatiaia National Park.

Finally, based on the morphological and molecular features described herein, *I. saltatori*, *I. trinciferri* and *I. similis* are reported from five captive breeding colonies of *S. similis* in the surroundings of the Itatiaia National Park, highlighting the risks ranging from transmissions to epizootics for wild saltators in the park.

Acknowledgements We are thankful to the breeders of green-winged saltators located in the surroundings of the Itatiaia National Park, for permitting and assisting with the collection of the material.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). CM has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). MSO has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). JLG-O has a scholarship from CNPq (Grant/Award Number: 142183/2020-2). BPB has fellowships from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Collecting permits were issued by CEUA/UBM (protocol 007/2018). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in the article.

References

- Barreto, C., Vilela, D. A. R., Houry, B. F., Lara, L. B., Torres, A. C. D., Silva, A. S. G., Castro Filho, R. P. L., Costa, C. S., & Martins, N. R. S. (2020). New *Isospora* and Host Species in Brazilian Passerines. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 22, 01–14. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1070>
- Berto, B. P., Balthazar, L. M. C., Flausino, W., & Lopes, C. W. G. (2008). Two new coccidian parasites of green-winged saltator (*Saltator similis*) from South America. *Acta Protozoologica*, 47, 263–267.
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W. L., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto, B. P., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2014). Studies on coccidian oöcysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 1–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2020). Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, 106, 707–713. <https://doi.org/10.1645/19-148>
- BirdLife International. (2021). IUCN Red List for birds. <http://www.birdlife.org>. Accessed 21 out 2021.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Coelho, C. D., Berto, B. P., Neves, D. M., de Oliveira, V. M., Flausino, W., & Lopes, C. W. G. (2012). Diagnóstico e tratamento das coccidioses em trinca-ferros-verdadeiros *Saltator similis* d'Orbigny Lafresnaye, 1837 mantidos em regime de quarentena. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 34, 46–54.
- Coelho, C. D., Berto, B. P., Neves, D. M., Oliveira, V. M. D., Flausino, W., & Lopes, C. W. G. (2013). Oocyst shedding by green-winged-saltator (*Saltator similis*) in the diagnostic of coccidiosis and *Isospora similis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 64–70. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100012>
- Destro, G. F. G., Pimentel, T. L., Sabaini, R. M., Borges, R. C., & Barreto, R. (2012). Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil. In G. A. Lameed (Ed.), *Biodiversity enrichment in a diverse world* (pp. 421–436). Londres.
- Dolnik, O. V., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2009). Individual oöcysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. G. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
- Freitas, M. F. L., Oliveira, J. B., Cavalcanti, M. D. B., Leite, A. S., Magalhaes, V. S., Oliveira, R. A., & Evencio-Sobrino, A. (2002). Gastrointestinal parasites of captive wild birds in Pernambuco state, Brazil. *Parasitologia Latinoamericana*, 57, 50–54.
- ICMBIO. (2016). Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 21 out 2021.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Lopes, B. B., Berto, B. P., Massad, F., & Lopes, C. W. G. (2007). *Isoospora vanriperorum* Levine, 1982 (Apicomplexa: Eimeriidae) in the green-winged saltator, *Saltator similis* (Passeriformes: Cardinalinae) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16, 211–214. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612007000400006>
- Li, J., Xing, T., Wang, L., Tao, J., & Liu, Z. (2010). Inhibitory effect of S-nitroso-glutathione on *Eimeria tenella* oocysts was mainly limited to the early stages of sporogony. *Veterinary Parasitology*, 173, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.022>
- Maia-Gouvêa, E. R., Gouvêa, É., & Piratelli, A. (2005). Comunidade de aves de sub-bosque em uma área de entorno do Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 859–866. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000400009>
- McQuiston, T. E., & Capparella, A. (1992). Two new coccidian parasites from the slate-colored grosbeak (*Pitylus grossus*) of South America. *Journal of Parasitology*, 78, 805–807. <https://doi.org/10.2307/3283308>
- Norton, C. C., & Joyner, L. P. (1981). *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology*, 83, 269–279. <https://doi.org/10.1017/S0031182000085280>
- Ogedengbe, J.D., Hanner, R.H., & Barta, J.R. (2011). DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*, 41, 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>
- Oliveira, P. S. D., Ferreira, M. A., Silva, L. M. D., Rodrigues, M. B., Cardozo, S. V., & Berto, B. P. (2017). Diversity and distribution of coccidia of wild birds in an Atlantic forest fragment area in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26, 457–464. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017063>
- Oliveira, M. S., Mello, E. R., Cardozo, S. V., Oliveira, A. A., Lima, V. M., Ferreira, I., Berto, B. P. (2021) Distribution, redescription and molecular identification of *Isoospora striata* McQuiston et. al 1997 (Eimeriidae) from wood-creepers (Dendrocolaptidae) in South America. *Parasitology Research*, 120, 2585–2593. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07140-9>
- Pacheco, J. F., Silveira, L. F., Aleixo, A., Agne, C. E., Bencke, G. A., Bravo, G. A., Brito, G. R. R., Cohn-Haft, M., Maurício, G. N., Naka, L. N., Olmos, F., Posso, S. R., Lees, A. C., Figueiredo, L. F. A., Carrano, E., Guedes, E. C., Cesari, E., Franz, I., Schunck, F., Piacentini, V. Q. (2021) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. *Ornithology Research*, 29, 94–105. <https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 pp.
- Ribenboim, L. C. D. (2017). *Aves do Parque Nacional do Itatiaia*. Taubaté: Dica de Turismo Publicações, 67 pp.
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., & Ryan, U. (2015). *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Observations on an *Eimeria* sp. (Apicomplexa) from the green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) in Southeastern Brazil: an example of how the ecological aspects of the host can be essential for the identification of its coccidians

Lucas de Assis Silva Andrade¹ · Jhon Lennon Genovez-Oliveira¹ · Mariana de Souza Oliveira¹ · Ericson Ramos de Mello² · Sergian Vianna Cardozo³ · Águida Aparecida de Oliveira⁴ · Viviane Moreira de Lima⁵ · Ildemar Ferreira⁵ · Bruno Pereira Berto⁵

Received: 14 December 2021 / Accepted: 8 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Parasitism in kingfishers is very little reported and predominantly related to hemoparasites, helminths, and ectoparasites. The present study provided a morphological and genotypic study of an *Eimeria* sp. recovered from a green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) captured in the Marambaia Island, on the coast of the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. The coccidial density, some morphological aspects of its oocysts, the molecular results, and, mainly, the ecological niche of *C. americana* in the mangrove of the Marambaia Island suggest that this coccidian species is a pseudoparasite.

Keywords Pseudoparasitism · Fish coccidia · Oocysts · Morphology · Sequencing · Marambaia Island

Introduction

Kingfishers are coraciiform birds that belong to the Alcedinidae family, which comprises 120 species worldwide (IUCN 2021). They have a wide geographic distribution, with most species occurring in tropical and subtropical zones, close to

aquatic environments (Sick 1997). In Brazil, there are five species, four of the genus *Chloroceryle* Kaup, 1848 plus the ringed kingfisher *Megaceryle torquata* (Linnaeus, 1766) (Pacheco et al. 2021).

The green kingfisher *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) is the most common alcedinid bird in Brazil, where it lives along rivers, lakes, coastlines, mangroves, and river mouths. This species feeds mainly on fish from 3 to 5.5 cm; however, it is a very generalist species and is also observed feeding on small vertebrates and invertebrates (Sick 1997; WikiAves 2021).

Parasitism in *C. americana* is very little reported and restricted to hemoparasites, helminths, and ectoparasites (Roda and Farias, 1999; López-Jiménez et al. 2018; Carvalho et al. 2021), although there is a report of an *Eimeria* sp. from green kingfishers in the Municipality of Rio Branco in the State of Acre in Northern Brazil (Almeida-Brito et al., 2017). In this context, the present study aims to report oocysts from an *Eimeria* sp. recovered from fecal samples of a *C. americana* captured in the mangrove of Marambaia Island, on the Brazilian coast, associating this finding with a possible pseudoparasitism. Additionally, the present study provided a genotypic identification, in addition

Section Editor: Berit Bangoura.

✉ Bruno Pereira Berto
bertobp@ufrj.br

- ¹ Programa de Pós-Graduação Em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas E da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural Do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil
- ² Programa de Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil
- ³ Programa de Pós-Graduação Em Biomedicina Translacional, Universidade Do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brazil
- ⁴ Departamento de Microbiologia E Imunologia Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, IVRJ 23897-000, Brazil
- ⁵ Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

Published online: 14 February 2022

Springer

to morphological study for this *Eimeria* sp., via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene.

Materials and methods

Sample collection

Two expeditions in June 2019 and November 2021 were conducted in the mangrove of Marambaia Island (23°3'52.90"S, 43°59'22.80"W), on the coast of the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil, where five *C. americana* were captured with mist nets (two in 2019 and three in 2021). The kingfishers were kept in individual boxes and fecal droplets collected immediately after defecation. After identification of the species, the birds were photographed and released and fecal droplets were placed in centrifuge tubes containing a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v).

Morphological analysis

Samples were transported to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), incubated at 23–28 °C, and regularly oxygenated by shaking of the centrifuge tubes for 7 days. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eurekam 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analysis

Twelve oocysts of the same morphotype under light microscopy, which were recovered from a single fecal droplet, were isolated, resuspended in PBS, and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al. 2009). DNA was extracted from the oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze–thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out as previously described by Genovez-Oliveira et al. (2020). The primers: JAVF (5'-CTGAATTTG

GTTCAGGTGTTGGT-3') and JAVR (5'-TACACCAGT AGTACCTCCAAGGG-3') produced a PCR product size of ~651pb. For amplification, a 25-µl PCR reaction was prepared using 3µL of genomic DNA (<1 µg), 12.5µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0.25 µL of each Primer (0.2 µM), and 9µL of Nuclease Free Water. PCR was conducted using the following cycling conditions: 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 45 s, and 72 °C for 50 s and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). The PCR product was sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for coccidian species at the COI sequences aligned with additional isolates from GenBank. *Taxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. Distance analyses and phylogenies were conducted using MEGA X (Kumar et al. 2018). Briefly, Sanger sequencing chromatogram files were imported into MEGA X and the nucleotide sequences of each genic region were curated, analyzed, and aligned with reference sequences from GenBank using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) trees were constructed and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA X. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results and discussion

Of the five green kingfishers examined, only one of them captured in June 2019 was passing coccidian oocysts in their feces. More precisely, of the five fecal droplets collected from this kingfisher, only two had 8 and 12 oocysts. These oocysts (Fig. 1A–E) are subspherical, 14.7 (14–15) × 13.8 (13–14), with length/width (L/W) ratio of 1.07 (1.0–1.1). Oocyst wall bi-layered and smooth, about 1.0 thick. Micropyle, oocyst residuum is absent, but 1–2 small polar granules are present. Sporocysts irregularly ovoidal, 9.6 (9–10) × 5.6 (5–6) µm, with L/W ratio of 1.72 (1.5–1.9). Stieda body thin and flattened, 0.5 high × 1.0 wide. Substieda body rounded, 1.0 high × 1.5 wide. Parastieda body absent. Sporocyst residuum present, consisting of numerous granules that appear to be membrane-bounded. Sporozoites with anterior and posterior refractile bodies.

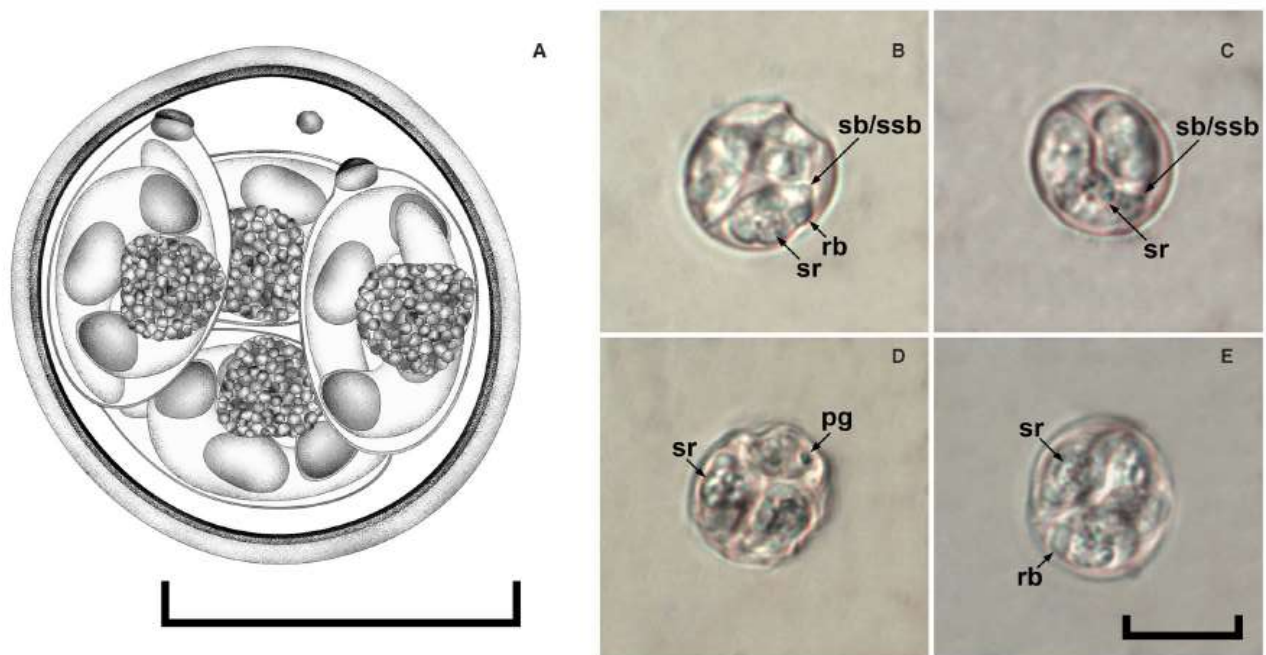


Fig. 1 Composite line drawing (A) and photomicrographs (B–E) of sporulated oocysts of an *Eimeria* sp. recovered from a green kingfisher *Chloroceryle americana*. Note the polar granule (pg); Stieda

and sub-Stieda bodies (sb/ssb); sporocyst residuum (sr); and refractile body (prb). Scale bar: 10 μ m

Photomicrographs, line drawing, and oocysts in 2.5% $K_2Cr_2O_7$ solution (Williams et al. 2010) are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRJ, under repository number 119/2021. Photovouchers of the *C. americana* specimen are deposited in the same collection.

The only descriptive reports of *Eimeria* spp. from alcedinid birds were by Varghese (1977) who described *Eimeria galateai* Varghese, 1977 from common paradise-kingfishers *Tanysiptera galatea* Gray, 1859 and *Eimeria duncani* Varghese, 1977 from sacred kingfishers *Todiramphus sanctus* (Vigors & Horsfeld, 1827) in Papua New Guinea. *Eimeria galateai* is similar in size to *Eimeria* sp. of this study; however, it is different for its elongate ovoidal oocysts with protrusions on the ends. *Eimeria duncani* has ovoidal oocysts truncated at the narrower end and is larger than the oocysts of this study. In Varghese (1977), kingfishers were kept in individual, coccidia-free cages, and fed on larval and adult insects, reducing the risk of contamination and/or pseudoparasitism by predation on parasitized prey. Furthermore, fresh fecal samples were obtained with hundreds of unsporulated oocysts that ensured the host-parasite relationship between kingfishers and *Eimeria* spp.

Alternately, some aspects of the finding of this *Eimeria* sp. from *C. americana* on Marambaia Island raise doubts whether this is a true parasitic relationship. First, the

research group of Prof. Bruno Pereira Berto has been researching coccidia of birds on Marambaia Island since 2007 (Lopes et al. 2013), where more than a hundred green kingfishers have been captured since then, all of which, to date, were coccidia-negative. The island has three predominant biomes: Atlantic Forest, Restinga, and mangrove; however, the vast majority of expeditions conducted by the research group on the island were carried out in areas of Atlantic Forest, with only the June 2019 and November 2021 expeditions being carried out in the mangrove, where the abundance and diversity of prey for *C. americana* is quite different (Sick 1997). In this context, from an ecological point of view, it is very reasonable that these oocysts are, in fact, parasites of some prey of *C. americana* in the mangrove of Marambaia Island, mainly fish, but also other animals that may be ingested, digested, and eliminated by green kingfishers. Secondly, the low number of oocysts observed in less than half of the collected fecal droplets and oocysts with shriveled walls (even in short time in saturated solution) suggests that these oocysts are possibly not parasites of this green kingfisher captured in 2019. This hypothesis of pseudoparasitism is similar to that addressed by Trefanová et al. (2019) for isosporan coccidia recovered from rodents that would be their pseudoparasites and true parasites of passerines.

In order to confirm this hypothesis in the present study, in the expedition in the mangrove of the Marambaia Island

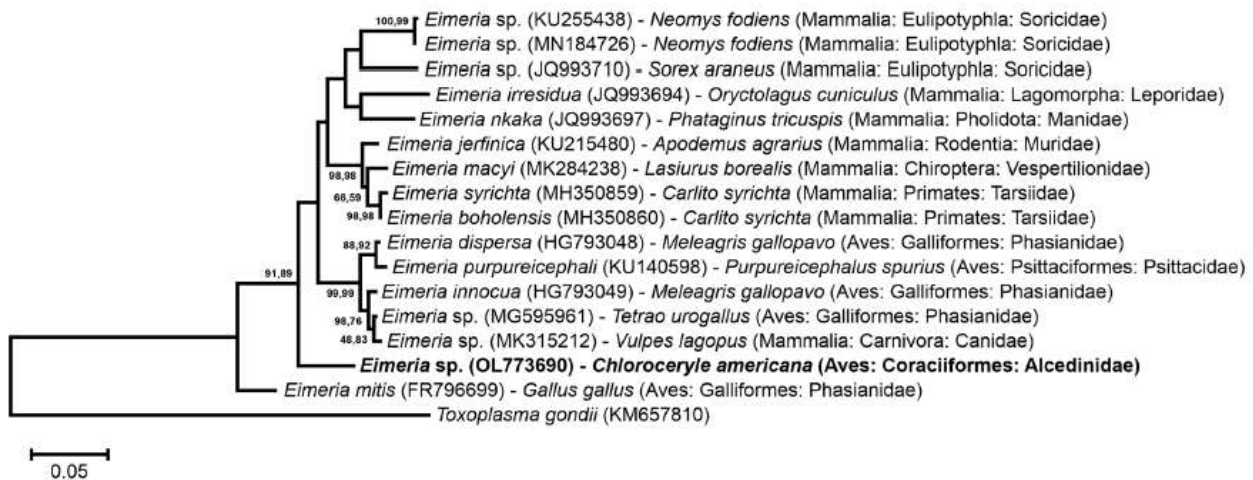


Fig. 2 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for neighbor-joining and maximum likelihood,

respectively. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

in 2021, some poeciliid fish were caught in the mangrove streams close to the localities where the green kingfishers were captured with mist nets, but these fish were coccidia-negative. It is noteworthy that, if this pseudoparasitism hypothesis is correct, the identification of the true host of this *Eimeria* sp. is quite difficult, as the feeding habits of green kingfishers can be quite generalist, especially in the mangrove of the Marambaia Island, which offers a great diversity of fish, amphibians, reptiles, crustaceans, and other animals that are potential prey (Sick 1997; Luz et al. 2008; Santos 2009; WikiAves 2021). Another option to determine if the kingfishers are the true hosts of this *Eimeria* sp. is to euthanize the kingfishers and examine the intestinal tract histologically for endogenous stages of the coccidian; however, in Brazil, the native birds are protected by law and supervised by IBAMA (Brazilian Institute of the Environment and Natural Renewable Resources). In any case, the morphology of the oocysts observed from the green kingfisher in this study is typical of *Eimeria* spp. of fish, both in relation to size, since fish coccidia tend to have small oocysts, as well as the morphology of the oocyst wall, which tends to be more delicate and shrivel easily (Molnár and Fernando 1974; Dyková and Lom 1981; Molnár 2000; Couso-Pérez et al. 2019). This delicate wall is also typical of *Goussia* spp., which are predominantly reported from fish (Molnár 2000); however, the oocysts in the present study had constant four sporocysts per oocyst, with Stieda and sub-Stieda bodies, which are inherent characteristics of the *Eimeria* genus.

Molecular identification by the COI gene (GenBank accession number: OL773690) reinforces the hypothesis that this *Eimeria* sp. is distant from *Eimeria* spp. of birds, since the highest genotypic similarities were only 93%

with *Eimeria* spp. of rodents, primates, canids, bats, psittaciforms, and galliforms. Thus, the phylogenetic analysis placed this *Eimeria* sp. of *C. americana* separated from a clade with *Eimeria* spp. of mammals and birds (Fig. 2). It is assumed that *Eimeria* sp. of this study was not molecularly close to *Eimeria* spp. of fish due to not having deposits of fish coccidia for COI gene in GenBank. In fact, *Eimeria* spp. from fish deposited in GenBank were predominantly sequenced for ribosomal genes (Molnár et al. 2012) and, therefore, in the present study, sequencing for genic regions of the 18S and 28S ribosomal genes was also intended, but the amplifications for these genes were not successful. Anyway, in the study with ribosomal genes by Molnár et al. (2012), it was observed that *Eimeria* spp. of fish are related to *Eimeria* spp. of mammals and birds, similarly to what was observed in the phylogeny of the present study; that is, the phylograms have similar topology in these studies even using different genes, with the fish coccidia clustering adjacent to the *Eimeria* spp. of mammals and birds (Fig. 2).

In conclusion, the present study identifies strong ecological, morphological, and molecular evidence that suggest a pseudoparasitism scenario of this *Eimeria* sp. from *C. americana* in the mangrove of Ilha da Marambaia, which true host is a fish or other prey item ingested by the kingfisher and then shed in its feces.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Brazilian Navy, especially to the command of CADIM (Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia), that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). LASA has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). JLG-O has a scholarship from CNPq (Grant/Award Number: 142183/2020–2). MSO has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). BPB has fellowships from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019–0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Declarations

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 54951; 70132) and CEUA (protocols UFRRJ-IV-6606250616; UNIGRANRIO-021/2019). All applicable institutional, national, and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

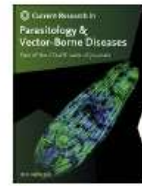
- Almeida-Brito AS, Guilherme E, Araújo-Santos FG, Mesquita RP, Gomes FA (2017) Endoparasites of wild birds from campus area and zoobotanical park, at the federal university of Acre, Rio Branco-Acre. *Arq Ciê Vet Zool UNIPAR* 20:117–122
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1–15
- Carvalho AM, Ferreira FC, Araújo AC, Hirano LQL, Paludo GR, Braga EM (2021) Molecular detection of *Leucocytozoon* in red-legged seriemas (*Cariacana cristata*), a non-migratory bird species in the Brazilian Cerrado. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 100652
- Couso-Pérez S, Ares-Mazás E, Gómez-Couso H (2019) First molecular data on *Eimeria truttae* from brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitol Res* 118:2121–2127
- Dyková I, Lom J (1981) Fish coccidia: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *J Fish Dis* 4:487–505
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169–174
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *J Parasitol* 83:333–336
- Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitol Int* 75:102040
- IUCN (2021) The IUCN Red List of Threatened Species. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 03 Dec 2021
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549
- Lopes BB, Berto BP, Ferreira I, Luz HR, Lopes CWG (2013) Coccidian distribution from passerines in an area of Atlantic Forest in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil. *Coccidia* 1:10–16
- López-Jiménez A, De León GPP, García-Varela M (2018) Molecular data reveal high diversity of Uvulifer (Trematoda: Diplostomidae) in Middle America, with the description of a new species. *J Helminthol* 92:725–739
- Luz HR, Costa LM, Prata ÁF, Moraes D, Ferreira I, Esbérard CEL (2008) *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Aves: Coraciiformes) predando lagarto Gymnophthalmidae. *Lundiana* 9:77–77
- Molnár K, Fernando CH (1974) Some new *Eimeria* (Protozoa, Coccidia) from freshwater fishes in Ontario. *Canada Can J Zool* 52:413–419
- Molnár K (2000) Two new coccidia, a *Goussia* and an *Eimeria* spp. from the gut of Kessler's goby (*Gobius kessleri* Günther) in the River Danube. *Acta Protozool* 39:323–329
- Molnár K, Ostoros G, Dunams-Morel D, Rosenthal BM (2012) *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. *Infect Genet Evol* 12:1810–1815
- Pacheco JF, Silveira LF, Aleixo A, Agne CE, Bencke GA, Bravo GA, Brito GRR, Cohn-Haft M, Maurício GN, Naka LN, Olmos F, Posso SR, Lees AC, Figueiredo LFA, Carrano E, Guedes EC, Cesari E, Franz I, Schunck F, Piacentini VQ (2021) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. *Ornithol Res* 29:94–105
- Roda SA, Farias ÂMID (1999) Wild birds infested by Phthiraptera (Insecta) in Pernambuco North Zona da Mata. *Rev Bras Zool* 16:871–878
- Santos EM (2009) Notas sobre predação de anuros em uma poça temporária no nordeste do Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 25:77–82
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p 862
- Trefancová A, Mácová A, Kvičerová J (2019) Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? *Protist* 170:104–120
- Varghese T (1977) *Eimeria galataei* sp. n. from the paradise kingfisher, and *Eimeria duncani* sp. n. from the sacred kingfisher in Papua New Guinea. *J Protozool* 24:209–210
- WikiAves (2021) Wiki Aves - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Available from: <<https://www.wikiaves.com.br>>. Accessed 03 Dec 2021
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst Parasitol* 76:69–76

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Contents lists available at ScienceDirect

Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases

journal homepage: www.editorialmanager.com/crpvbd/default.aspx

Isoospora basileuterusi n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae) in South America

Ericson R. Mello^a, Mariana S. Oliveira^b, Lucas de Assis S. Andrade^b, Sergian V. Cardozo^c, Ágüida A. Oliveira^d, Viviane M. Lima^e, Bruno P. Berto^{e,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^e Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Coccidia

Isoospora

Oocyst morphology

Sequencing *cox1*

New species

Neotropical birds

Parulidae

Parque Nacional do Itatiaia

ABSTRACT

Isoospora basileuterusi Mello & Berto n. sp. is described based on material from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) captured in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in south-eastern Brazil. Oocysts of the new species are ellipsoidal to ovoidal, measuring on average $25.2 \times 21.1 \mu\text{m}$, with a smooth, bi-layered wall, $\approx 1.6 \mu\text{m}$ thick. Micropyle and oocyst residuum are both absent, but one to three polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal to lemon-shaped, measuring on average $15.3 \times 9.5 \mu\text{m}$, with a knob-like Stieda body and a trapezoidal sub-Stieda body. Sporocyst residuum is present, usually as a body of membrane-bound granules. Sporozoites are vermiform, with refractile bodies. Four of the 19 warblers captured (21%) were infected with the new species. Molecular analysis of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene revealed a similarity of 99.5% between the new species and *Isoospora serinus* Yang, Brice, Elliot & Ryan, 2015 from island canaries *Serinus canaria* (L.) in Western Australia. The oocysts of *I. basileuterusi* n. sp. can be distinguished from the four other *Isoospora* spp. recorded in hosts of the Parulidae, and from the molecularly most closely related species, by the typical ellipsoidal to lemon-shaped sporocysts, with small sub-Stieda body and a membrane-bound sporocyst residuum. Therefore, based on the morphological and molecular features, *I. basileuterusi* n. sp. is the fifth species described in a host of the family Parulidae and the first molecularly characterized via sequencing the *cox1* gene.

1. Introduction

Brazil is the second country in the Neotropical region with the highest number of bird species, with about 1971 species listed by the Brazilian Ornithological Records Committee (Pacheco et al., 2021), which corresponds to half of the diversity of the Neotropical avifauna (Dias, 1992). In relation to research on Neotropical birds, the study of their parasites has been highlighted for their association with ecology, biology and species conservation. Among their parasites, coccidian protozoans

are important as a cause of morbidity and mortality, especially in captive birds or impacted environments, thus acting as ecological biomarkers (Berto & Lopes, 2020).

The golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus* (Deppe) is a passerine bird of the family Parulidae with a wide distribution in the Neotropical region (Sick, 1997; Pacheco et al., 2021). It has insectivorous eating habits and occupies the middle stratum of the ombrophilous forests (Marini & Cavalcanti, 1993; Lima & Manhães, 2009). The present study provides a description and molecular characterization of a new

* Corresponding author. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ, 23897-000, Brazil.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100079>

Received 29 December 2021; Received in revised form 19 January 2022; Accepted 24 January 2022

2667-114X/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

species of *Isoospora* from golden-crowned warblers *B. culicivorus* captured in the Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia), a conservation unit in south-eastern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

A total of 9 expeditions were conducted between 2014 and 2019 in the Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO, 2021), in August (22°26'19"S, 44°37'23"W) and November (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2014; March (22°27'38"S, 44°35'34"W) 2015; March (22°19'46"S, 44°32'11"W) and October (22°27'38"S, 44°35'34"W) 2016; July (22°26'15"S, 44°18'33"W) and November (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2017; August (22°26'57"S, 44°36'25"W) 2018; March (22°26'17"S, 44°37'33"W) 2019. A total of 19 *B. culicivorus* were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes and faeces collected immediately after defecation. After identification to the species level, the bird was photographed and released, and stool samples were placed in centrifuge tubes containing 2.5% potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v).

2.2. Morphological analyses

Samples were examined at the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). All samples were incubated at room temperature (25 °C) for 10 days or until c.70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014a). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera Eureka S.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications (Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT) from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version, 2020; Corel Corporation, Canada). All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

2.3. Molecular data generation

An individual oöcyst was isolated from serial dilutions of the oöcysts in drops on a microscope slide using a sterile micropipette. This isolated oöcyst was resuspended in PBS and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al., 2009). DNA was extracted from the oöcyst using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Four freeze-thaw cycles were applied prior to DNA extraction in order to achieve complete lysis of the oöcysts. PCR amplification of a partial fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene (c.250 bp) was carried out using nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers CO1bF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and CO1bR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3'), produced an amplicon of c.302 bp in size and the internal primers CO1bF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA C-3') and CO1bR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µl of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs, São Paulo, Brazil) (1 ×), 0.25 µl of each primer (0.2 µM), 9 µl of nuclease-free water and 3 µl of DNA (for the primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR amplifications were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles (94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s,

and 72 °C for 1 min) and a final extension step at 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round PCRs were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

2.4. DNA sequence analyses

All PCR amplicons were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. The newly generated sequence was compared to those for *Isoospora* spp. and other coccidian parasites available in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The phylogenetic tree was constructed using the newly generated *cox1* sequence aligned with sequences for 18 species of *Isoospora* available on GenBank. Distance analyses and phylogenies were conducted using MEGA X (Kumar et al., 2018). Briefly, Sanger sequencing chromatogram files were imported into MEGA X and the nucleotide sequences were curated, analyzed, and aligned with reference sequences from GenBank using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Maximum likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) trees were constructed, and the distances computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA X. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

3. Results

Nineteen *B. culicivorus* were examined and four (21%) were positive for coccidian oöcysts of a morphotype not reported in the scientific literature. These positive warblers were captured in November 2014 and August 2018 on a trail named "Trilha das Borboletas" (Trail of the Butterflies) (22°26'57"S, 44°36'25"W), and in March 2019 at the starting point of the "Travessia Ruy Braga" (Ruy Braga Crossing) (22°26'17"S, 44°37'33"W) in the Itatiaia National Park. This material is described below.

3.1. *Isoospora basileuterusi* Mello & Berto n. sp.

3.1.1. Taxonomic summary

Type-host: *Basileuterus culicivorus* (Deppe) (Passeriformes: Parulidae), warbler.

Type-locality: Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57"S, 44°36'25"W), Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oöcysts in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution (Williams et al., 2010) are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labcoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-124/2021. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Site in host: Unknown.

Prevalence: 21% (4 out of 19 birds examined).

Representative DNA sequence: One representative *cox1* sequence was deposited in the GenBank database under the accession number OM025014.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in Article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 2012) details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) of the article is urn:lsid:zoobank.org:pub:DC2F625C-B798-46DE-84F6-F6883A90E4A5. The LSID for the new name *Isoospora basileuterusi* Mello & Berto n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:26689BA2-AA9-4E41-B90E-E40C5934137B.

Etymology: The specific epithet is derived from the genus name of the type-host.

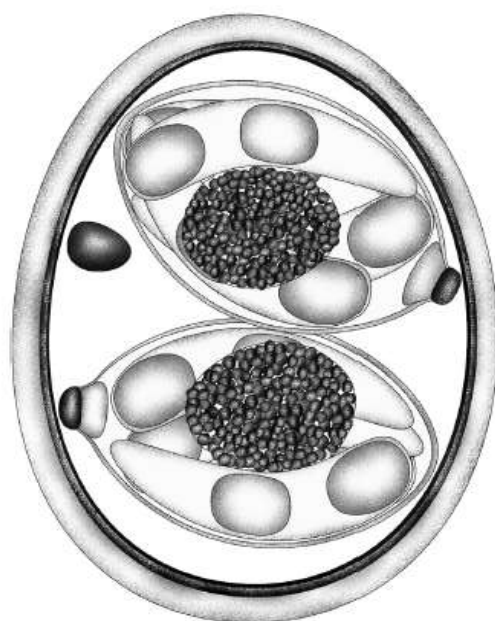


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isospora basileuterusi* from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus*. Scale-bar: 10 μ m.

3.1.2. Description

[Based on 25 oocysts and 25 sporocysts; Figs. 1 and 2.] Oocysts ellipsoidal to ovoidal, 22–28 \times 17–23 (25.2 \times 21.1); L/W ratio 1.1–1.3 (1.20). Wall bi-layered, 1.5–1.9 (1.6) thick, outer layer smooth. Micropyle and oocyst residuum both absent, but one to three (usually one) polar granules present, 2.4–3.0 \times 1.7–2.4 (2.7 \times 2.0). Sporocysts 2, ellipsoidal to lemon-shaped, 14–17 \times 8–11 (15.3 \times 9.5); L/W ratio 1.4–1.8 (1.61). Stieda body present, knob-like, 0.9–1.1 \times 1.7–2.1 (1.0 \times 1.8); sub-Stieda present, trapezoidal, 1.1–1.7 \times 2.5–2.9 (1.4 \times 2.7); para-Stieda body absent; sporocyst residuum present, usually a distinctly ovoidal to ellipsoidal body consisting of numerous small granules that appear to be membrane-bound, 4.3–5.2 \times 3.5–4.3 (3.9 \times 4.8). Sporozoites 4, vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and



Fig. 2 Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora basileuterusi* from the golden-crowned warbler *Basileuterus culicivorus*. Abbreviations: inner (il) and smooth outer (sol) layers of the oocyst wall; polar granule (pg); Stieda (sb) and sub-Stieda bodies (ssb); sporocyst residuum (sr); posterior (prb) and anterior (arb) refractile bodies. All to same scale. Scale-bar: 10 μ m.

indiscernible nucleus.

3.1.3. Remarks

To date, four *Isospora* spp. are recorded from warblers (Tables 1 and 2). The sizes of the oocysts of all these species are reasonably compatible with *I. basileuterusi* n. sp.; however, these can be easily distinguished by a few characteristic features: the new species is the only one with ellipsoidal to lemon-shaped sporocysts, small sub-Stieda body and membrane-bound sporocyst residuum. Additionally, *I. basileuterusi* n. sp. does not have the typical characteristics of the other species, such as the absence of polar granules in *Isospora cardellinae* Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur & Soriano-Vargas, 2016 and *Isospora celata* Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes & Soriano-Vargas, 2014 (see Berto et al., 2014b;

Table 1
Comparative morphological data for oocysts of *Isospora* spp. recorded from warblers (Parulidae)

Species	Host	Shape	Size (μ m)	Shape index	Polar granules	Oocyst residuum	Wall (μ m)	Micropyle	Reference
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello & Berto n. sp.	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe)	Ellipsoidal to ovoidal	22–28 \times 17–23 (25.2 \times 21.1)	1.1–1.3 (1.20)	Present, 1–3 (usually one)	Absent	1.5–1.9 (1.6)	Absent	Present study
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur & Soriano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson)	Subspherical	23–28 \times 23–27 (26.6 \times 25.4)	1.0–1.1 (1.1)	Absent	Absent	1.2–1.4 (1.3)	Absent	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes & Soriano-Vargas, 2014	<i>Leiothypis celata</i> (Say)	Subspherical	27–30 \times 25–28 (28 \times 26)	1.0–1.1 (1.1)	Absent	Present	1.0–1.3 (1.2)	Absent	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbiseminas</i> Keeler, Yabsley, Adams & Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson)	Subspherical to ovoidal	21–28 \times 19–25 (24.3 \times 22.3)	1.0–1.3 (1.0)	Absent or present, 0–4	Absent	–	Absent	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobruvi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Geothypis aequinoctialis</i> (Gmelin)	Subspherical to ovoidal	21–26 \times 20–24 (23.5 \times 21.6)	1.1–1.1 (1.1)	Present, 1	Absent	–	Absent	Berto et al. (2010)

Table 2
Comparative morphological data for sporocysts of *Isospora* spp. recorded from warblers (Parulidae)

Species	Host	Shape	Size (µm)	Shape index	Stieda body (µm)	Sub-Stieda body (µm)	Sporocyst residuum	Reference
<i>Isospora basileuterusi</i> Mello & Berto n. sp.	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppé)	Ellipsoidal to lemon-shaped	14–17 × 8–11 (15.3 × 9.5)	1.4–1.8 (1.61)	Present, knob-like, 0.9–1.1 × 1.7–2.1 (1.0 × 1.8)	Present, trapezoidal, 1.1–1.7 × 2.5–2.9 (1.4 × 2.7)	Granules membrane-bound	Present study
<i>Isospora cardellinae</i> Salgado-Miranda, Medina, Zepeda-Velázquez, García-Conejo, Galindo-Sánchez, Janczur & Soñano-Vargas, 2016	<i>Cardellina rubra</i> (Swainson)	Ovoidal	18–20 × 11–13 (19.0 × 12.0)	1.6–1.8 (1.7)	Present, knob-like, (1.1 × 2.4)	Present, trapezoidal to rounded, sometimes with irregular base, (1.8 × 4.5)	Scattered spherules	Salgado-Miranda et al. (2016)
<i>Isospora celata</i> Berto, Medina, Salgado-Miranda, García-Conejo, Janczur, Lopes & Soñano-Vargas, 2014	<i>Leiothlypis celata</i> (Say)	Ovoidal	15–20 × 11–14 (18 × 13)	1.4–1.5 (1.4)	Present, knob-like, (1.0 × 2.5)	Present, irregular, barely discernible, (1.5 × 4.0)	Scattered spherules	Berto et al. (2014)
<i>Isospora orbisreinitas</i> Keeler, Yabsley, Adams & Hernandez, 2014	<i>Basileuterus rufifrons</i> (Swainson)	Ovoidal	12–19 × 10–14 (16.0 × 11.8)	1.0–1.9 (1.4)	Present, knob-like	Present, prominent, trapezoidal and compartmentalized	Many diffuse granules	Keeler et al. (2014)
<i>Isospora piacobrai</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin)	Ovoidal	15–17 × 9–12 (15.8 × 10.5)	1.4–1.6 (1.5)	Present, knob-like and prominent, (1.0 × 1.7)	Present, large, trapezoidal and homogeneous, (2.3 × 4.8)	Granules of different sizes	Berto et al. (2010)

Salgado-Miranda et al., 2016), the presence of oöcyst residuum in *I. celata*, the compartmentalized sub-Stieda body in *Isospora orbisreinitas* Keeler, Yabsley, Adams & Hernandez, 2014 and the large and trapezoidal sub-Stieda body in *Isospora piacobrai* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 (see Berto et al. (2009); Keeler et al., 2014).

Isospora basileuterusi n. sp. also differs morphologically from the molecularly most closely related *Isospora* spp. (Fig. 3), *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot & Ryan, 2015 and *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020. The same characteristics typical of the new species, i.e. ellipsoidal to lemon-shaped sporocysts, small sub-Stieda body and membrane-bound sporocyst residuum, are not observed in *I. serinuse* and *I. oliveirai*.

3.2. Phylogenetic analysis

DNA amplification of the oöcyst of *I. basileuterusi* n. sp. showed a clear band of c.250 bp. Phylogenetic analysis included 18 sequences for avian

Isospora spp. available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup. *Isospora basileuterusi* n. sp. was recovered in a clade with the highest similarity of 99.5% with *I. serinuse* from island canaries *Serinus canaria* (L.) in Western Australia (Yang et al., 2015). Furthermore, *I. basileuterusi* n. sp. was closely related (95–97%) to *I. oliveirai* from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye) in south-eastern Brazil and *Isospora* spp. recovered from thrushes (Turdidae) and tits (Paridae) in Czech Republic (Trefančová & Kvičnerová, 2019; Ortúzar-Ferreira et al., 2020).

4. Discussion

Duszynski & Wilber (1997) compiled almost all taxonomic studies of coccidia of passerines and advised that new coccidian identifications should be based on comparative morphology between coccidian species recorded in the same host family. In this sense, the morphotype observed

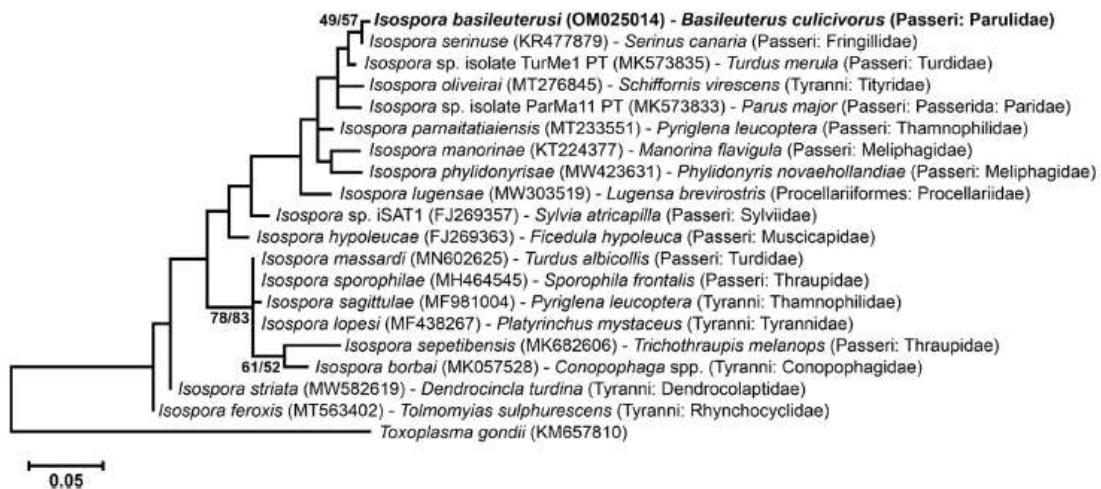


Fig. 3. Maximum likelihood tree for *Isospora* spp. estimated from the *cox1* sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for Neighbor-Joining and Maximum Likelihood, respectively. The scale-bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

from the golden-crowned warblers in this study, *I. basileuterusi* n. sp., was compared with the four recorded coccidian species of Parulidae, as shown in Tables 1 and 2. *Isospora basileuterusi* n. sp. differs in several characteristic features, but can be mainly differentiated from the others by the typical lemon-shape of its sporocysts.

The host of the new coccidian species described here, the golden-crowned warbler *B. culicivorus*, has a wide distribution in the Neotropical region, from Mexico to southern South America (Pacheco et al., 2021). However, according to BirdLife International (2021) this species is the stripe-crowned warbler, which is restricted to Mexico and Central America, not occurring in Brazil. This misinformation is due to species/subspecies status within the genus *Basileuterus* Cabanis. Birdlife have reclassified some subspecies of *B. culicivorus* to the species level, such as *Basileuterus culicivorus auricapilla* (Swainson, 1838) which has been reclassified to the level of species, as *Basileuterus auricapilla* Swainson, 1838. Therefore, this study followed the name listed by the Brazilian Ornithological Records Committee (Pacheco et al., 2021); however, it is noteworthy that the bird specimen in this study is identified as *B. auricapilla* by BirdLife International (2021). Anyway, regardless of the specific identification within *Basileuterus*, due to the wide geographical distributions of warblers (Parulidae) in the Americas, their coccidian species must be equally distributed throughout the Neotropical region.

In the present study, the molecular identification of *I. basileuterusi* n. sp. was performed using the *cox1* gene, which is considered to be the gene with the highest resolution in detecting recent speciation events (Barta, 2001; Ogedengbe et al., 2011). In fact, the 250 bp *cox1* gene sequence was not 100% similar to any other deposited on GenBank, contrary to what occurs with ribosomal gene sequences that are more conserved and more suitable for phylogenetic studies of families and orders (Genovez-Oliveira et al., 2020). On the other hand, the region of the *cox1* sequenced for *I. basileuterusi* n. sp. did not provide conclusive results related to ancestry, as linked to host family, biogeographical region, morphology/biology of the coccidian species, etc. (Fig. 3). This is also observed when *Isospora* spp. amplified and sequenced with the primers (Dolnik et al., 2009) used in the present study are exclusively included in the phylogeny, as in the studies of Yang et al. (2015) and Silva-Carvalho et al. (2018). Perhaps the short sequence of only 250 bp did not allow greater resolution in the phylogenetic study; in this case, sequences with more than 600 bp from other regions of the *cox1* gene, such as those generated by the JAV primer (Genovez-Oliveira et al., 2020), would show better phylogenetic estimations in the future. Finally, in the present study these JAV primers were not successful in amplifying the samples; however, it has been shown in any case that mitochondrial genes, such as *cox1*, are better suited to work with individual oöcysts, as the number of copies of mitochondrial DNA is far greater than the number of copies of nuclear DNA, thus favoring the amplification of mitochondrial genes (Dolnik et al., 2009).

5. Conclusion

The comparison of *I. basileuterusi* n. sp. with *Isospora* spp. described from Neotropical warblers clearly supports the designation as a unique species. Therefore, *I. basileuterusi* is considered as new to science, which is the fifth species described in a host of the family Parulidae and the first molecularly characterized via sequencing the *cox1* gene.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. MSO has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). LASA has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has fellowships from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Ethical approval

Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45,200; 49,605; 54,951; 70,132), CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616) and CEUA/UNIGRANRIO (protocol 021/2019). All applicable institutional, national and international guidelines for the care and use of animals were followed.

CRedit author statement

The study was designed by SVC, VML and BPB. Field work was performed by MSO, LASA and BPB. Laboratory procedures for maintenance, recovery, measurements, photomicrographs and isolation of oöcysts were performed by MSO and LASA. DNA extraction, amplification and sequencing were performed by ERM, AAO and VML. BPB analyzed the data and drew the coccidian oöcyst. The manuscript was written by ERM and BPB and subsequently revised by all other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Data availability

Photosyntypes, line drawing, and oöcysts in 70% ethanol are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-124/2021, along with the photographs of the type-host specimen (symbiotype). The generated sequence for *I. basileuterusi* n. sp. is deposited in the GenBank database under the accession number OM025014.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

References

- Barta, J.R., 2001. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Vet. Parasitol.* 101, 175–186.
- Berto, B.P., Luz, H.R., Flaúsinio, W., Ferreira, I., Lopes, C.W.G., 2010. *Isospora piacabrai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the masked yellowthroat *Geothlypis aequinoctialis* (Gmelin) (Passeriformes: Parulidae) in South America. *Syst. Parasitol.* 75, 225–230.
- Berto, B.P., McIntosh, D., Lopes, C.W.G., 2014a. Studies on coccidian oöcysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 1–15.
- Berto, B.P., Medina, J.P., Salgado-Miranda, C., García-Conejo, M., Janczur, M.K., Lopes, C.W.G., Soriano-Vargas, E., 2014b. *Isospora celata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the orange-crowned warbler *Oreothlypis celata* (Say) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. *Syst. Parasitol.* 89, 253–257.
- Berto, B.P., Lopes, C.W.G., 2020. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *J. Parasitol.* 106, 707–713.
- BirdLife International, 2021. IUCN Red List for birds. Available from: <http://www.birdlife.org>. (Accessed 22 December 2021).
- Dias, B.F.S., 1992. Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis. Fundação Pró-Natureza, Brasília.
- Dolnik, O.V., Palinauskas, V., Bensch, S., 2009. Individual oöcysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J. Parasitol.* 95, 169–174.
- Duszynski, D., Wilber, P., 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J. Parasitol.* 83, 333–336.
- Genovez-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Thode-Filho, S., Cardozo, S.V., Oliveira, A.A., Lima, V.M., et al., 2020. Morphological and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Mitozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitol. Int.* 75, 102040.
- ICMBIO, 2021. Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/pamaitatiaia>. (Accessed 22 December 2021).

- ICZN, 2012. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bull. Zool. Nomencl.* 69, 161–169.
- Keeler, S.P., Yabsley, M.J., Adams, H.C., Hernandez, S.M., 2014. A novel *Isoospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from warblers (Passeriformes: Parulidae) of Costa Rica. *J. Parasitol.* 100, 302–304.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
- Lima, A.L.D.C., Manhães, M.A., 2009. Hábitos alimentares de *Basileuterus culicivorus* (Aves: Parulidae) em uma área de Mata Atlântica secundária, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 9, 137–143.
- Marini, M.A., Cavalcanti, R.B., 1993. Habitat and foraging substrate use of three *Basileuterus* warblers from central Brazil. *Ornitol. Neotrop.* 4, 69–76.
- Ogedengbe, J.D., Hamner, R.H., Barta, J.R., 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *Int. J. Parasitol.* 41, 843–850.
- Ortúzar-Ferreira, C.N., Genoves-Oliveira, J.L., Oliveira, M.S., Mello, E.R., Thode-Filho, S., Oliveira, Á.A., et al., 2020. *Isoospora oliveirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America. *Acta Parasitol.* 65, 843–851.
- Pacheco, J.F., Silveira, L.F., Aleixo, A., Agne, C.E., Bencke, G.A., Bravo, G.A., et al., 2021. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. *Ornithol. Res.* 29, 94–105.
- Salgado-Miranda, G., Medina, J.P., Zepeda-Velázquez, A.P., García-Conejo, M., Galindo-Sánchez, K.P., Janczur, M.K., Soriano-Vargas, E., 2016. *Isoospora cartellinae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red warbler *Cardellina rubra* (Swainson) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. *Syst. Parasitol.* 93, 825–830.
- Sick, H., 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Silva-Carvalho, L.M., Pastura, D.G.N., Gomes, J.V., Siqueira, P.B., Rodrigues, M.B., Lima, V.M., Berto, B.P., 2018. *Isoospora lopesi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Syst. Parasitol.* 95, 455–463.
- Trefančová, A., Kvičnerová, J., 2019. *Isoospora svevica* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new species of coccidium from the white-spotted bluethroat *Luscinia svecica cyaneocala* (Aves: Passeriformes: Muscicapidae). *Parasitol. Res.* 118, 3043–3051.
- Williams, R.B., Theba, P., Marshall, R.N., Marshall, J.A., 2010. Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst. Parasitol.* 76, 69–76.
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A., Ryan, U., 2015. *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp. Parasitol.* 159, 59–66.



Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from the plumbeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira¹ · Mariana S. Oliveira¹ · Lucas de Assis S. Andrade¹ · Ericson R. de Mello² · Viviane M. Lima³ · Bruno P. Berto³

Received: 10 May 2023 / Accepted: 3 November 2023 / Published online: 14 December 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

The current work aimed to analyze, morphologically, statistically, and molecularly, oocysts shed from plumbeous pigeons, *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), from a locality at 2197 m of altitude near the Agulhas Negras peak, the highest point of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The oocysts were extremely polymorphic, being subspheroidal, ovoidal, or ellipsoidal, in addition to having the random presence/absence of characteristic features associated with the oocyst wall, such as micropyle, micropyle cap, lateral micropyle, and outer veil/rough wall. Linear regression confirmed the extreme polymorphism of oocysts, showing that if all combinations of taxonomic characters in oocysts (morphotypes) were overestimated, 19 different species could be identified/described. In contrast, the means comparison analysis between oocysts with the presence/absence of characteristic features and the histograms showed equivalences and regularity in the distribution in the classes of measures, which indicate the presence of a single species in the measured oocysts. Molecular analyses were performed from the isolation of individual oocysts of different morphotypes, which had their genetic material extracted, amplified, and sequenced in 4 non-overlapping *loci* in the *cox1* and *cox3* genes and fragments of the small and large subunit rDNA of mitochondrial DNA. The sequences were 100% identical between the morphotypes, with the exception of a very small divergence observed at the *locus* that partially covers the *cox3* gene. The phylogenetic analysis was inconclusive for the *locus* within the *cox1* gene traditionally used for eimeriid coccidians; however, the other *loci* should have a promising future for phylogenetic studies when more sequences for the same genic regions are deposited in GenBank. Finally, the multifactorial analysis of the current work supported that the polymorphic oocysts shed from *P. plumbea* are a single species, which was named *Eimeria patagioenasae*, making this the twenty-second eimerian description from Columbiformes.

Keywords *Eimeria patagioenasae* · Coccidia · Oocysts · Phylogeny · Neotropical birds · Parque Nacional de Itatiaia

Section Editor: Berit Bangoura

✉ Mariana S. Oliveira
mariana.s.o@hotmail.com

✉ Bruno P. Berto
bertobp@ufrj.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

³ Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

Introduction

Knowledge of the parasite diversity of wild animals is quite scarce when compared to what is known about the diversity of parasites in domestic animals and humans. In a recent study, Duszynski (2021) points out that of the current diversity of vertebrates, only a very small portion was examined for coccidians. Also, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) showed at the time that of the 367 species of columbiform birds in the world, only 15 were reported as coccidian hosts.

Pigeons and doves (Columbiformes) are hosts for a wide range of parasites, from ectoparasites such as hippoboscids, mallophages, lice, and mites to endoparasites such as

helminths, hemoprotozoans, and coccidians (Atkinson et al. 2008; Taylor et al. 2017). In this sense, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) provided a taxonomic review of eimeriid coccidians from Columbiformes, where 19 *Eimeria* spp. and 2 *Isospora* spp. are recorded. Since then, two new descriptions of *Eimeria* spp. have been added: *Eimeria chalcopterae* Yang et al. 2020 and *Eimeria ferreirai* (Oliveira and Berto 2020; Oliveira et al. 2020; Yang et al. 2020). Therefore, currently, a total of 21 *Eimeria* spp. are recorded from columbiform birds.

Based on this, the current work examined fecal samples of wild birds in a locality at 2197 m of altitude near the Agulhas Negras peak, the highest point of the State of Rio de Janeiro. Oocysts with different shapes and irregular characteristic features were observed from plumbeous pigeons, *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), which is a columbiform species with medium forest dependency and related to well-preserved environments in South America, and in southeastern Brazil, mainly observed on the slopes of mountainous regions (Sick 1997; Mello et al. 2020; BirdLife International 2023). A detailed morphological study of these polymorphic oocysts is provided here, associated with statistical and molecular studies, aiming at the specific identification of these oocysts.

Materials and methods

Sample collection

A single expedition was conducted in the high-altitude plateau of the Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo (ICMBIO 2023). This expedition took place in November 2021, specifically at km 13 of the “Travessia Ruy Braga” (Ruy Braga Crossing) (22°24′29.97″S; 44°39′04.07″W), which is the trail that leads to the high altitude plateau where the Agulhas Negras peak is located. Mist nets were used to capture the birds. Three plumbeous pigeons, *P. plumbea*, were captured. The captured birds were specifically identified (Ridgely et al. 2015; Mello et al. 2020), photographed, and banded with numbered metal rings provided by the Brazilian bird-ringing agency (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE). Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of feces from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution (Dolnik 2006).

Morphological analyses

Samples were examined at the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). All samples were incubated at room temperature (25 °C) for 7 days. Forty oocysts were isolated by flotation in Sheather’s sugar-saturated solution (specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings, photomicrographs, and other figures were edited using two software applications (Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT) from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 2020, Corel Corporation, Canada). All measurements were made in micrometers and are presented as the range followed by the mean in parentheses.

Statistical analyses

Three statistical methods were employed after the previous evaluation of the data by D’Agostino’s test of normality: (1) Analysis of variance (ANOVA) was used to compare measurements of the length, width, and length/width (L/W) ratio of the oocysts and sporocysts with different characteristic features, using the statistical package Biostat 5.0 (Ayres et al. 2007) to calculate the mean, variance, degree of freedom, and *p* value (Sampaio 2002; Berto et al. 2014); (2) histograms were prepared to plot the values of length, width and the L/W ratio of the oocysts, as well as their relative frequencies, according to the methods of Sampaio (2002) and Berto et al. (2014); and (3) linear regression to determine the distribution of oocysts using methods proposed by Norton and Joyner (1981) and subsequently modified by Berto et al. (2014). The graphs, line regression, data points, the R² (coefficient of determination) value, and the coefficient of the regression line were obtained using the software Microsoft Excel 2007® (Microsoft, Redmond, Washington).

Molecular analyses

Individual oocysts, morphologically analyzed in detail and photomicrographed under light microscopy, were isolated and resuspended in 90 µl of PBS (i.e., every single oocyst with analyzed morphology was contained in each PBS suspension), according to the guidelines of Dolnik et al. (2009). Four freeze–thaw cycles (−4 °C and 96 °C, respectively) of 5 min each were applied to break the

oocyst wall before the DNA extraction to achieve complete oocyst lysis. After this step, 10 µl of proteinase K was added, leaving it to incubate in a water bath at 56 °C for approximately 2 h. Complete DNA extraction was performed using the Qiagen DNeasy™ Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification of four different (non-overlapping) *loci* of the mitochondrial genome was targeted (Fig. 1). Three of these *loci* were designed using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), and the fourth was the COIBF1 *locus*, primarily developed by Dolnik et al. (2009) and extensively applied to eimeriid coccidians since then (Table 1). For amplification, a 25-µl PCR reaction was prepared using 3 µl of genomic DNA (< 1 µg), 12.5 µl of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0.25 µl of each Primer (0.2 µM) and 9 µl of nuclease-free water. PCR amplifications were conducted using the cycling conditions shown in Table 1. Amplicons from the nested PCRs were purified using the Qiagen MinElute™ PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses

All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited in the Chromas 2.6 program. Sequences were compared with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Alignments were created in MEGA v10.2.6 using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Phylogenetic relationships were reconstructed using Bayesian Inference in the MrBayes v3.2.7 (Ronquist et al. 2012) and the maximum likelihood method in MEGA (Kumar et al. 2018). The best-fitting evolutionary models for all phylogenetic analyses were selected by the Model Selection in MEGA. Bayesian Inference analysis was conducted under the GTR+G evolutionary model for 1,000,000 generations, and the trees were summarized after removing 25% of burn-in. Maximum likelihood analysis was conducted under the TN93+G evolutionary model, and the bootstrap values were calculated by 1,000

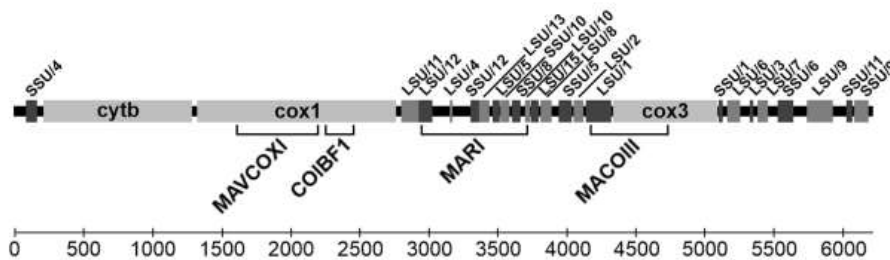


Fig. 1 Mitochondrial genome organization of *Eimeria* spp. from birds (based on the complete mitochondrial genome of *Eimeria dispersa* available on GenBank/BLAST under accession number KJ608416): the *loci* MAVCOXI (positioned between ~1600 and 2200 nt) and COIBF1 (positioned between ~2250 and 2500 nt) occupy the gene

cox1; the MARI *locus* (positioned between ~2950 and 3750 nt) occupies fragments of small subunit (SSU) and large subunit (LSU) rDNA, and the MACOIII *locus* (positioned between ~4200 and 4750 nt) occupies the LSU/1 rDNA fragment and the *cox3* gene

Table 1 Primers and cycling conditions for PCR amplification of four *loci* of the mitochondrial genome

Locus	Primer	Primer sequence	Cycling conditions
COIBF1	COIBf1 (external; forward)	5'-GWTATTAGTATGGGCACATCA-3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 45 °C for 45 s, 72 °C for 30 s, and a final extension of 72 °C for 5 min
	COIBr1 (external; reverse)	5'-CCAAGAGATAATACRAARTGGAA-3'	
	COIBf2 (internal; forward)	5'-GGGCACATCATATGATGAC-3'	
	COIBr2 (internal; reverse)	5'-ATAGTATGTATCATGTARWGCAA-3'	
MACOIII	MACOIII _f (forward)	5'-CTGTAGAGTCGAGATGGAAACAA-3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 42 s, and a final extension of 72 °C for 5 min
	MACOIII _r (reverse)	5'-CCTAGAATAACACTGGCTGTAGATAG-3'	
MAVCOXI	MAVCOXI _f (forward)	5'-GCCAGGTCATATGGTGGATATG-3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 54 s, and a final extension of 72 °C for 5 min
	MAVCOXI _r (reverse)	5'-TGCCCAGACTAATGAACCTAAC-3'	
MARI	MARI _f (forward)	5'-GCTCATCACCCCTTGACTT-3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 54 s, and a final extension of 72 °C for 5 min
	MARI _r (reverse)	5'-CCCGGCTAAACTTCCCTTATT-3'	

replicates. The resultant phylogenetic trees were visualized in MrBayes and MEGA and exported in FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Results

Prevalence and description

Three plumbeous pigeons (*P. plumbea*) were examined, and two were positive for coccidian oocysts. These oocysts were polymorphic in size, shape, and the presence/absence of certain characteristic features; however, in any case, all morphotypes were distinct from those coccidian species recorded as parasites of Columbiformes (Table 2). This material is described below.

Eimeria patagioenasae Ortúzar-Ferreira & Berto n. sp. (Figs. 2 and 3)

Kingdom: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Phylum: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970

Class: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclass: Coccidia Leuckart, 1879

Family: Eimeriidae Minchin, 1903

Genus: *Eimeria* Schneider, 1875

Oocyst ($n = 40$) subspheroidal (18%), ovoidal (45%), or ellipsoidal (37%): $21\text{--}31 \times 16\text{--}23$ (26.1×20.1); L/W ratio: 1.0–1.6 (1.31). Wall bi-layered, 1.5–2.0 (1.8 μm) thick, outer layer smooth, $c. 2/3$ of total thickness. Some oocysts (38%) had a wrinkled membrane (probably the outer veil) adhered to the outer layer of the oocyst wall, leading to a rough appearance of the oocyst wall. Micropyle present at the longitudinal end of most oocysts (78%), 2.0–9.2 (4.7) wide; randomly associated with a micropyle cap (48%), 0.8–2.7 high \times 4.0–10.5 wide (1.6 \times 7.1). A lateral micropyle was observed in some oocysts (35%), 3.9–8.9 (6.6) wide. Oocyst residuum is absent, but 1–2 polar granules (usually 1) are present: 2.3–3.1 \times 1.3–2.4 (2.7 \times 1.8). Sporocyst ($n = 27$) elongate ellipsoidal to fusiform: 13–18 \times 6–8 (15.0 \times 7.4); L/W ratio: 1.8–2.3 (2.04). Stieda body present, flattened to knob-like, barely discernible from the sub-Stieda body in some sporocysts, 0.4–0.9 high \times 0.9–1.5 wide (0.6 \times 1.2). Sub-Stieda body present, rounded to trapezoidal, 0.8–1.4 high \times 1.3–2.2 wide (1.0 \times 1.8). Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum is present, consisting of numerous granules scattered among the sporozoites. Sporozoites vermiform, with posterior and anterior refractile bodies, 3.4–5.9 \times 2.4–3.3 (4.4 \times 2.8), and a central nucleus.

Diagnosis

Eimeria patagioenasae is the only coccidian species recorded from the host species *P. plumbea*. The oocysts of *E. patagioenasae* are primarily identifiable by the random presence of micropyle, micropyle cap, lateral micropyle, and outer veil/rough wall, which may be subspheroidal, ovoid, or ellipsoidal, in addition to the characteristic features typical of the fusiform sporocysts with Stieda and sub-Stieda bodies (Figs. 2 and 3). Based on these and other taxonomic characters, differences between *E. patagioenasae* and other *Eimeria* spp. recorded from Columbiformes are summarized in Table 2. Of the 21 coccidian species recorded from Columbiformes to date, only *Eimeria turturi* Golemsky 1976, has a shape (L/W ratio mean of 1.3) and size compatible with *E. patagioenasae*; however, this species is easily differentiated by the absence of micropyle and polar granule, in addition to the shape, size, and other characteristic features of the sporocysts. *Eimeria kapotei* Chatterjee and Ray 1969; *Eimeria waiganiensis* Varghese 1978; *Eimeria duculai* Varghese 1980; *Eimeria palumbi* McQuiston 1991; *Eimeria zenaidae* Adriano et al. 2003; *Eimeria janovyi* Bandyopadhyay et al. 2006; *Eimeria columbapalumbi* Jamriška and Modrý, 2012; *Eimeria lyoni* Yabsley et al. 2015; and *E. chalcopterae* are slightly similar in size (but not shape) to *E. patagioenasae*, in addition to being easily differentiated by the absence of micropyle and/or other characteristic features of sporocysts. *Eimeria ferreirai* is slightly similar to *E. patagioenasae*, which are sympatric (hosts and coccidians) in Itatiaia National Park; however, *E. patagioenasae* can be differentiated, in addition to size and shape, by micropyles randomly present, sporocyst shape, and Stieda and sub-Stieda bodies slightly distinct, while *E. ferreirai* has only a well-defined Stieda body as an excystment structure.

Taxonomic summary

Type host: *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Aves: Columbiformes: Columbidae), plumbeous pigeon.

Type locality: high altitude plateau of the Itatiaia National Park (22°24'29.97"S; 44°39'04.07"W), Southeastern Brazil.

Type-material: photosyntypes, line drawing and oocysts in 2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution (Williams et al. 2010) are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-132/2023. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COIBF1, MACOIII, MAVCOXI and MARI loci showed clear bands around ~250 bp, ~632 bp, ~653 pb, and ~824 bp, respectively (Fig. 4). Representative sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers:

Table 2 Comparative morphology of *Eimeria* spp. recorded from Columbiformes of the World

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts				Sporecysts										
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residium	Micropyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stield body	Substield body	Residium
<i>Eimeria leibicani</i> (Lubbe, 1896) Pinto 1928	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Asia, India	Pinto (1928)	Subspherical to ovoidal	17-21 (17.2)	16-18 (16.7)	1.0-1.1 (1.09)	Smooth	Absent	Present	Present	Ovoidal	11-14 (12.4)	5-7 (6.4)	(1.4)	-	-	Present
<i>Eimeria columbae</i> (Mitra and Das-Gupta 1937)	<i>C. livia</i>	Asia, India	Neeschulz (1935)	Subspherical to ellipsoidal	15-18 (16.7)	14-16 (15.3)	1.0-1.1 (1.09)	Smooth	Absent	Absent	Present	Ellipsoidal	-	-	-	Present	Absent	Present
<i>Eimeria columbae</i> (Mitra and Das-Gupta 1937)	<i>C. livia</i>	Asia, India	Mitra and Das-Gupta (1937)	Subspherical to ellipsoidal	16-21 (18.5)	14-17 (15.5)	1.0-1.4 (1.19)	Smooth	Absent	Present, 1-3	Present, 1-3	Ovoidal or slightly reniform	11-14 (12.2)	5-7 (5.9)	1.9-2.3 (2.08)	Present, prominent triangular	Absent	Present
<i>Eimeria sphegocerae</i> (Vigors, 1832)	<i>Theron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Asia, India	Ray (1952)	Rhombiform to ellipsoidal	17-25 (19.2)	12-15 (12.6)	-	Smooth with a lateral dent	Absent	Present, asymmetric with a micro-pyle cap	Present, asymmetric	Broadly ovoidal	17-19 (17.5)	12-14 (12.5)	-	-	-	Present
<i>Eimeria kaposi</i> (Chatterjee and Ray 1969)	<i>C. livia</i>	Asia, India	Chatterjee and Ray (1969)	Subspherical	24-30 (26.1)	22-26 (23.5)	-	-	-	Present, anterior	Present, 1-2	Ovoidal	8-10	-	-	Present	-	Present, scattered
<i>Eimeria nairii</i> (Golemansky 1976)	<i>Streptopelia nairii</i> (Linnæus, 1758)	Europe, Bulgaria	Golemansky (1976)	Ellipsoidal or broadly ovoidal	23-29 (26)	18-25 (21.6)	-	Smooth, 1.5	Absent	Absent	Absent	Elongate ellipsoidal	11-13	6-8	-	Absent	-	Present, scattered
<i>Eimeria watsoni</i> (Varghese 1978)	<i>Chalcophaps indica</i> (Linnæus, 1758); <i>Oxyechus indicus</i> (Gmelin, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	Broadly ovoidal	22-25 (24)	19-23 (22)	1.1-1.2 (1.1)	Smooth, 1.5	Absent	Present, 4-6 (5)	Present, 2-4	Ovoidal	9-11 (10.0)	6-8 (7.0)	-	Present, prominent	Present, small	Present, scattered
<i>Eimeria alvandi</i> (Varghese 1980)	<i>Diucula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Broadly ovoidal	26-31 (28)	23-27 (25)	(1.1)	Smooth, 1.5-2.5 (2.0)	Absent	Incomplete	Present, 1-2.0	Elongate	14-16 (15.5)	6-8 (7.2)	-	Present, prominent, conical	Absent	Present, compacted, membrane-bounded
<i>Eimeria gaurii</i> (Varghese 1980)	<i>Gauria vicinifera</i> (Preston, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Subspherical	19-22 (20)	18-21 (20)	(1.0)	Smooth, 1.0	Absent	Absent	Present, 1-2.0	Elongate	10-13 (12.0)	4-6 (5.5)	-	Present	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria palumbi</i> (McQuisition 1991)	<i>Zenaidura macroura</i> (Gmelin, 1841)	South America, Ecuador, Galapagos Islands	McQuisition (1991)	Ovoidal to ellipsoidal	22-27 (24.2)	19-24 (21.7)	1.0-1.2 (1.16)	Smooth, 2.0	Present, rounded to splinter-like granules	Absent	Absent	Ellipsoidal	15-17 (15.3)	8-9 (8.1)	1.8-2.1 (1.9)	Present, nipple-like	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria curvata</i> (Adriano et al. 2000)	<i>Columba infans</i> (Flemming, 1899); <i>Columba squamata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano et al. (2000)	Ovoidal to ellipsoidal	17-19 (18.3)	15-17 (15.5)	1.1-1.3 (1.2)	Smooth, 1.3	Absent	Present	Present	Elongate	11-13 (12.3)	5-6 (5.8)	2.0-2.2 (2.1)	Present, protuberant, nipple-like	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria zoolae</i> (Adriano et al. 2003)	<i>Zenaidura macroura</i> (Gmelin, 1841)	South America, Brazil	Adriano et al. (2003)	Subspherical	22-26 (23.8)	19-22 (20.3)	(1.2)	Rough, 1.7	Absent	Absent	Present, 1	Elongate	12-14 (13.1)	7-8 (7.4)	1.7-1.9 (1.8)	Present, large	Absent	Present, scattered

Table 2 (continued)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts				Sporocysts				Residium						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residium	Microspore	Polar granule		Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substielia body
<i>Eimeria janozoyi</i> Bandyopadhyay et al. 2006	<i>C. ibis</i>	Asia, India	Bandyopadhyay et al. (2006)	Ellipsoidal	24.3	19.8	(1.2)	Smooth, ~1.1	Absent	Present, 1, sub-spherical	Pyriiform	12.1	10.1	(1.2)	Present, large, prominent	Absent	Present, scattered	
<i>Eimeria ibidis</i> Alyoussif et al. 2009	<i>C. ibis</i>	Asia, Saudi Arabia	Alyoussif et al. (2009)	Elongate ellipsoidal	19–21 (21)	14–17 (15)	(1.2)	Smooth, 1–1.3 (1.2)	Present, irregular globules	Absent	Ellipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	Present, small, nipple-like	Absent	Present, scattered	
<i>Eimeria colombo-bapatimbi</i> Jambirka and Mody 2012	<i>Colombia polunin-bus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Czech and Slovak Republics	Jambirka and Mody (2012)	Ellipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0–1.4 (1.28)	Smooth, 0.6–1.5 (0.9)	Absent	Present, 2 irregular, lar., ~2.0	Elongate ovaloid, slightly asymmetrical	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7–2.2 (1.9)	Present	Absent	Present, scattered	
<i>Eimeria macroura</i> (Petersen, 1843)	<i>Macroura (Linnaeus, 1758)</i>	Africa, Madagascar	Ball et al. (2012)	Subspherical	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0–1.2 (1.1)	Smooth, ~0.8	Absent	Absent	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	Present	Present		
<i>Eimeria fijiensis</i> Yabsley et al. 2015	<i>Zenaidura macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley et al. (2015)	Subspherical to ovaloid	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1–1.3 (1.2)	Smooth, ~1.0	Absent	Present, 1–2	Ovaloid	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5–1.9 (1.7)	Present, knob-like	Present, rounded	Present, scattered, granules of ~1.0	
<i>Eimeria sp. of Yang et al. (2016)</i>	<i>C. ibis</i>	Oceania, Australia	Yang et al. (2016)	Subspherical	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	Smooth, ~1.0	Present	Present	Elongate ovaloid	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0–2.2 (2.1)	Present	Absent	Present, compact	
<i>Eimeria colombo-bapatimbi</i> Ortíz-Ferrera & Berro, 2019	<i>C. ulpuceni</i>	South America, Brazil	Ortiz-Ferrera et al. (2019)	Subspherical to ellipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0–1.2 (1.11)	Smooth, 1.0–1.2 (1.1)	Present, granules bounded and/or diffused	Absent	Inconspicuous	Ellipsoidal to slightly asymmetrical	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6–2.0 (1.77)	Present, flattened to half-moon-shaped	Present, rounded	Present, scattered
<i>Eimeria chalcopis</i> Yang et al. 2020	<i>Phaps chalcoptera</i> (Latham 1790)	Oceania, Australia	Yang et al. (2020)	Subspherical	22–25 (23.5)	21–24 (22.6)	1.0–1.1 (1.04)	Smooth, 1.0–1.4 (1.2)	Absent	Present, 2–3	Ellipsoidal	13–14 (13.5)	7–8 (7.2)	1.8–2.0 (1.88)	Present, flattened to half-moon-shaped	Present, rounded to trapezoidal	Present, semi-bone bounded granules	
<i>Eimeria ferruginea</i> Oliveira & Berro, 2020	<i>Lepus sylvaticus</i> (Linnaeus, 1758)	South America, Brazil	Oliveira et al. (2020)	Subspherical to ellipsoidal	19–25 (21.4)	16–21 (18.8)	1.0–1.4 (1.15)	Smooth, 1.3–1.9 (1.6)	Absent	Present, 1–2	Elongate ovaloid to boomerang-shaped	12–15 (13.4)	6–8 (6.9)	1.8–2.2 (1.95)	Present, triangular to lozenge	Absent	Present, scattered	
<i>Eimeria pinguicula</i> Ortíz-Ferrera & Berro, n. sp.	<i>Pinguicula planifolia</i> (Vahl, 1818)	South America, Brazil	Current work	Subspherical, ovaloid, or ellipsoidal	21–31 (26.1)	16–23 (20.1)	1.0–1.6 (1.31)	Smooth, 1.5–2.0 (1.8), sometimes with outer veil adhered	Absent	Present, 1–2	Elongate ellipsoidal to fusiform	13–18 (15.0)	6–8 (7.4)	1.8–2.3 (2.04)	Present, flattened to knob-like	Present, rounded to trapezoidal	Present, scattered	

OQ790143 (COIBF1, ovoidal oocyst with micropyle cap and micropyle); OQ790144 (COIBF1, subspheroidal oocyst with micropyle); OQ790137 (COIBF1, ellipsoidal oocyst with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle); OQ790145 (MACOIII, subspheroidal oocyst with micropyle); OQ790140 (MACOIII, ellipsoidal oocyst with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle); OQ790139 (MACOIII, ellipsoidal oocyst with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle); OQ790138 (MAVCOXI, ellipsoidal oocyst with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle); OQ790142 (MAVCOXI, ellipsoidal oocyst with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle); and OQ790141 (MARI, ellipsoidal oocyst with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle).

ZooBank registration: to comply with the regulations set out in Article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 2012), details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) of the article is urn:lsid:zoobank.org:pub:6EECB8CA-B2FB-4732-864A-B83ECED5D32E. The LSID for the new name *Eimeria patagioenasae* Ortúzar-Ferreira & Berto n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:F79F3CB8-22DD-4EE7-9F1E-8DDA8583A55F.

Site of infection: Unknown, oocysts were recovered from feces.

Prevalence: 67% (2 out of 3 birds examined).

Etymology: The specific name is derived from the generic name of the type host.

Statistical morphometric analyses

Means comparison analysis by ANOVA was performed according to the characteristic features in the oocyst wall, which were randomly present or absent. As shown in Table 3, means were equivalent ($p > 0.01$), in all morphometric dimensions between oocysts with and without the outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle.

Histograms of length, width, and L/W ratio of the oocysts (Fig. 5) and sporocysts (Fig. 6) were regular as the frequencies increased and decreased in the classes of measures. These results indicate a single species/population in the measured oocysts and sporocysts, according to the guidelines of Sampaio (2002) and Berto et al. (2014).

Linear regression was performed for all oocysts (Fig. 7) and sporocysts (Fig. 8), but each oocyst shape related to combinations of characteristic features (morphotype) was individualized and identified on the graphs. As noted, there was no combination of characteristic features correlated to oocyst size/shape in both oocyst and sporocyst linear regressions, since the same combinations of characteristic features coincided in subspheroidal, ovoid, and ellipsoidal

oocysts of different sizes. The very low R^2 value and the data points/oocysts distant from the regression line indicated the extremely polymorphic nature of the oocysts. In contrast, the linear regression of the sporocysts resulted in an R^2 value of 0.5, which is the borderline for determining a uniform distribution (Berto et al. 2014), as also confirmed by the closeness of the data points/sporocysts to the regression line.

Molecular and phylogenetic analyses

Molecular analyses of individual oocysts recovered from *P. plumbea* with different combinations of taxonomic characters (morphotypes) revealed the presence of eimeriid sequences differing from other coccidians deposited in the GenBank database.

At the COIBF1 locus, oocysts of three distinct morphotypes (subspheroidal with micropyle; ovoidal with micropyle cap and micropyle; and ellipsoidal with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle) were 100% identical to each other and 99% similar to *Isospora* spp. from passerines. *Eimeria columbinae* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2019, which was described from ruddy ground doves *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) in southeastern Brazil, was the closest eimerian species with 98.2% similarity. *Eimeria labbeana* (Labbe, 1896) Pinto 1928 and *E. ferreirai*, which are two other *Eimeria* spp. recorded from Columbiformes sequenced to this same COIBF1 locus, had 93.5% and 91.6% similarity, respectively.

At the MACOIII locus, an ellipsoidal oocyst with an outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle had 99.1% similarity with an oocyst of the same morphotype, except for the presence of the outer veil/rough wall. In contrast, this same ellipsoidal oocyst with an outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle had 99.8% similarity to a subspheroidal oocyst with only a micropyle at the longitudinal end. From these oocysts, the closest sequences deposited in GenBank at this MACOIII locus were from *Eimeria dispersa* Tyzzer, 1929 and *Eimeria innocua* Moore & Brown, 1952, which are parasites of turkeys, along with some *Isospora* spp. from passerines, with a similarity of 93%.

At the MAVCOXI locus, the same previously mentioned ellipsoidal oocysts of the same morphotype, except for the outer veil/rough wall, were 100% identical to each other. In comparison with sequences deposited in the GenBank, the closest was *E. innocua* and *E. dispersa*, with 92.6% and 91.8% similarity, respectively.

At the MARI locus, only the ellipsoidal oocysts with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle were successful in amplification and sequencing. In comparison with sequences from GenBank, again,

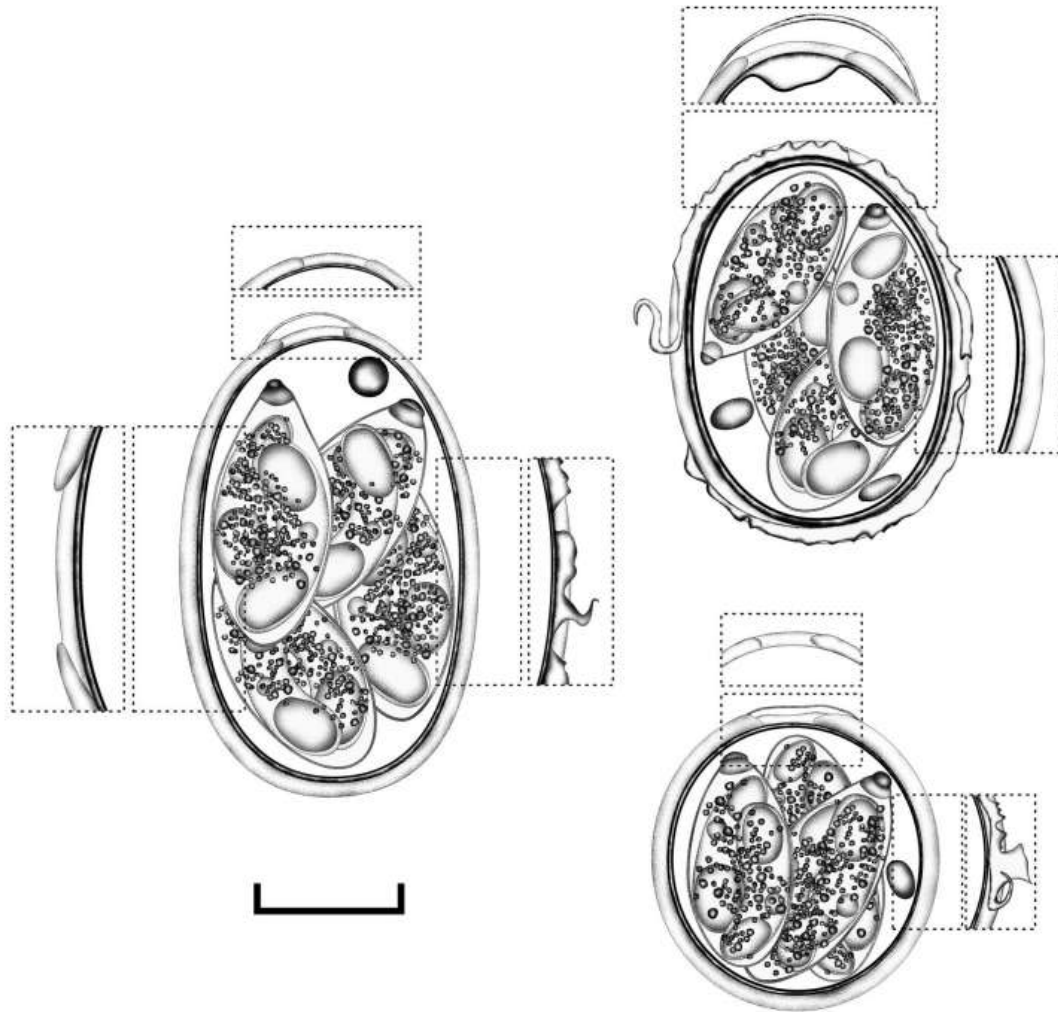


Fig. 2 Line drawings of ellipsoidal, ovoidal, and subspheroidal oocysts of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea*, with the random presence/absence of characteristic

features associated with the oocyst wall, such as micropyle, micropyle cap, lateral micropyle, and outer veil/rough wall. Scale bar: 10 μ m

E. innocua and *E. dispersa* were the closest, with 92.9% similarity.

Phylogenetic analysis based on the COIBF1, MACOIII, MAVCOXI, and MARI *loci* included sequences from coccidians available in GenBank (Figs. 9–12). An unnamed *Choleoeimeria* sp. (KT203395) from a prairie kingsnake, *Lampropeltis calligaster* (Harlan, 1827), was used as the outgroup. In the phylogenetic tree built from the COIBF1 *locus* (Fig. 9), the polymorphic oocysts from *P. plumbea* sat in a monophyletic group with *Isospora* spp. from passerines, being in polyphyly with the other *Eimeria* spp. of Columbiformes. In the phylogenetic tree built from the MACOIII *locus* (Fig. 10), the sequences of the current work sat in a large clade with *Eimeria* spp. from chickens, turkeys, geese, rabbits, and horses, in addition to *Isospora* spp. from

passerines and other eimeriid coccidians. Finally, in the phylogenetic trees built from the MAVCOXI and MARI *loci* (Figs. 11 and 12), monophyletic groups with *E. innocua* and *E. dispersa* were formed. This relationship was reasonably supported in all analyses.

Discussion

The minimum sample number of host specimens aiming at descriptions or reports of coccidian species is not consensual or predetermined, as can be seen in the scientific literature, where new coccidian species were described even by a single host bird (Berto et al. 2011). On the other hand, the greater the number of samples (from different specimens, species,

Fig. 3 Photomicrographs of sporulated oocysts of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea*: ellipsoidal (A–H), ovoidal (I–N), and subspheroidal oocysts (O–R). Note the inner layer (il), smooth outer layer (sol), and/or outer veil/rough outer layer (ov/rol) in the oocyst wall, lateral micropyle (lm), micropyle (m), micropyle cap (mc), nucleus (n), polar granule (pg), refractile body (rb), sporocyst residuum (sr), Stieda (sb), and sub-stieda (ssb) bodies. Scale bar: 10 μ m



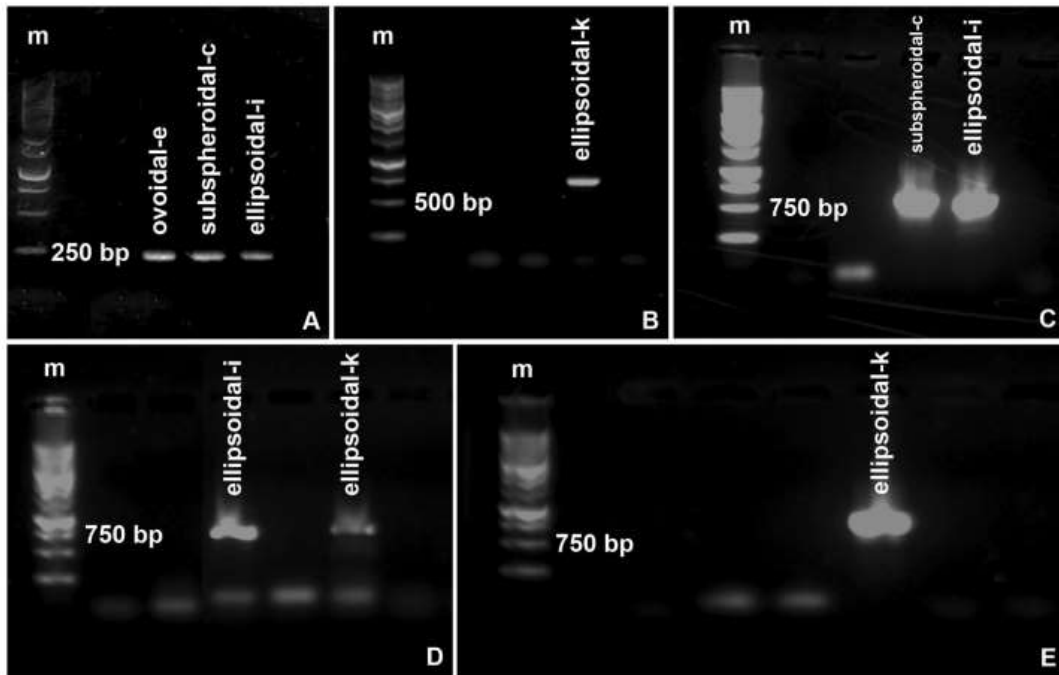


Fig. 4 Electrophoretic profile of PCR for COIBF1 (A), MACOIII (B, C), MAVCOXI (D), and MARI (E) loci of the mitochondrial genome of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea*, obtained in 1.2% agarose gel. Molecular weight marker (m) Promega 1 kb DNA ladder (250–10,000 bp). Morphotypes “subspheroidal-c”, “ovoidal-e”, “ellipsoidal-i” and “ellipsoidal-k” refer to the

extraction of DNA from individual oocysts subspheroidal with micropyle; ovoidal with micropyle cap and micropyle; ellipsoidal with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; and ellipsoidal with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; respectively

Table 3 Statistical analysis of mean comparisons of oocysts and sporocysts related to taxonomic characters randomly present or absent in oocysts of *Eimeria patagioenasae*

Morphometric dimensions	Characteristic features							
	Outer veil/rough wall		Micropyle cap		Micropyle		Lateral micropyle	
	Present (n=15)	Absent (n=25)	Present (n=19)	Absent (n=21)	Present (n=31)	Absent (n=9)	Present (n=14)	Absent (n=6)
Oocyst								
Length (µm)	26.0 (22–30) ^a	26.2 (21–31) ^a	26.9 (23–31) ^a	25.5 (21–31) ^a	26.1 (21–31) ^a	26.2 (22–31) ^a	26.6 (23–31) ^a	25.9 (21–31) ^a
Width (µm)	20.0 (18–22) ^a	20.1 (16–23) ^a	19.7 (16–22) ^a	20.4 (18–23) ^a	20.0 (16–22) ^a	20.4 (19–23) ^a	20.0 (16–22) ^a	20.1 (16–23) ^a
Length/width ratio	1.3 (1.1–1.5) ^a	1.3 (1.0–1.6) ^a	1.4 (1.1–1.6) ^a	1.3 (1.0–1.5) ^a	1.3 (1.0–1.6) ^a	1.3 (1.1–1.5) ^a	1.3 (1.2–1.5) ^a	1.3 (1.0–1.6) ^a
Sporocyst								
Length (µm)	15.6 (15–17) ^a	14.7 (13–18) ^a	15.1 (13–18) ^a	15.0 (13–17) ^a	14.9 (13–18) ^a	15.4 (15–17) ^a	15.7 (14–17) ^a	14.8 (13–18) ^a
Width (µm)	7.6 (6–8) ^a	7.2 (7–8) ^a	7.4 (7–8) ^a	7.3 (6–8) ^a	7.3 (7–8) ^a	7.4 (6–8) ^a	7.7 (7–8) ^a	7.2 (6–8) ^a
Length/width ratio	2.1 (1.9–2.3) ^a	2.0 (1.8–2.3) ^a	2.0 (1.8–2.3) ^a	2.1 (1.9–2.3) ^a	2.0 (1.8–2.3) ^a	2.1 (1.9–2.3) ^a	2.0 (1.9–2.2) ^a	2.0 (1.8–2.3) ^a

^aAll means (same letters) within each taxonomic character column were equivalent ($p > 0.01$)

and localities), the greater the delimitation and accuracy of the standardization/typification of a coccidian species (Ortúzar-Ferreira et al. 2021; Berto and Lopes 2020). The

low number of plumbeous pigeons (*P. plumbea*) captured and analyzed in the current study is justified by the rarity and difficulty of capturing this pigeon in the Itatiaia National

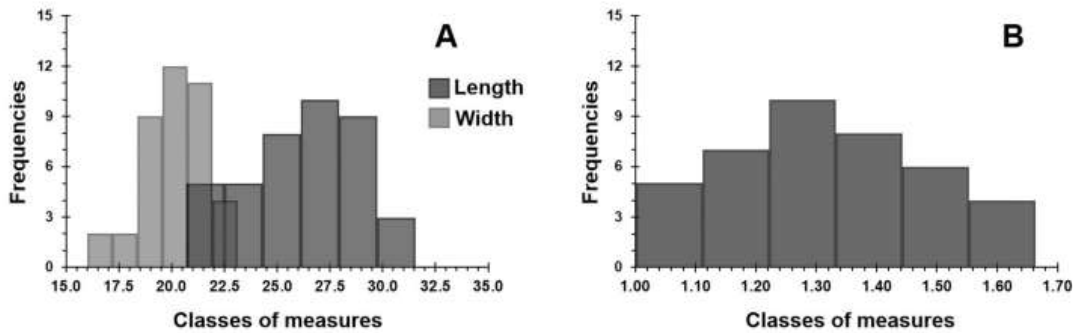


Fig. 5 Histograms of length and width (A) and length/width ratio (B) of oocysts of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea*

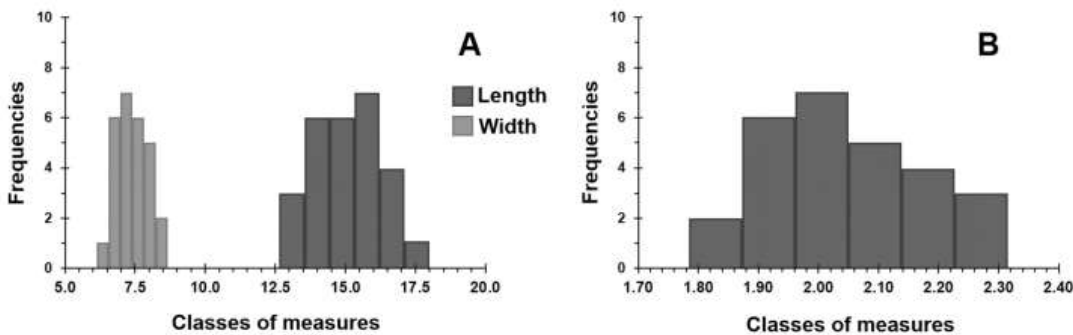


Fig. 6 Histograms of length and width (A) and length/width ratio (B) of sporocysts in oocysts of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea*

Park. After more than 10 years of bimonthly expeditions in the park, only these three specimens of *P. plumbea* were captured in this area of very difficult access and fieldwork in the high-altitude plateau of the Itatiaia National Park. In any case, the very reasonable number of oocysts analyzed (40) from two of the three captured plumbeous pigeons ensured an accurate morphological, statistical, and molecular study, not least because the complementary molecular studies were carried out on individual oocysts.

The oocysts, identified and described as *E. patagioenasae*, were extremely variable in size, shape, and the presence and absence of various characteristic features associated with the oocyst wall (Figs. 2 and 3). These variations were largely random; that is, it was not possible to standardize/typify certain sizes and shapes associated with the presence/absence of certain characteristic features (morphotypes). This assertion is also supported by the linear regression of the oocysts (Fig. 7), where 11 different combinations of characteristic features were randomly distributed along the regression line into oocysts of different sizes and shapes. If each combination of characteristic features associated with a shape/size of oocyst were overestimated, 19 different morphotypes/species could be

identified/described. In contrast, sporocysts were uniform, morphologically and morphometrically, within oocysts of distinct morphotypes, as shown in Fig. 8, reinforcing the hypothesis of a single species in the observed oocysts. Allied to this, the histograms were regular in the frequencies distributed in the classes of measures (Figs. 5 and 6), and the means comparison analysis showed that there are no significant differences between oocysts with and without micropyle, micropyle cap, lateral micropyle, and outer veil/rough wall (Table 3); therefore, strongly indicating the presence of a single species in the fecal samples of *P. plumbea*. Some eimerian species were differentiated and described based on moderate variations in size, shape, and roughness of the oocyst wall, as in Casas et al. (1995) in the description of three new species of *Eimeria* spp. from capybaras, in contrast to Flausino et al. (2014), which re-described *Eimeria caviae* Sheather, 1924, as having subspheroidal, ovoidal, and ellipsoidal oocysts from Guinea pigs. In the current work, based primarily on morphological and statistical morphometric analyses of the oocysts, a conservative evaluation and identification were defined, indicating the extreme variations in certain taxonomic characters as intraspecific, that is, polymorphism.

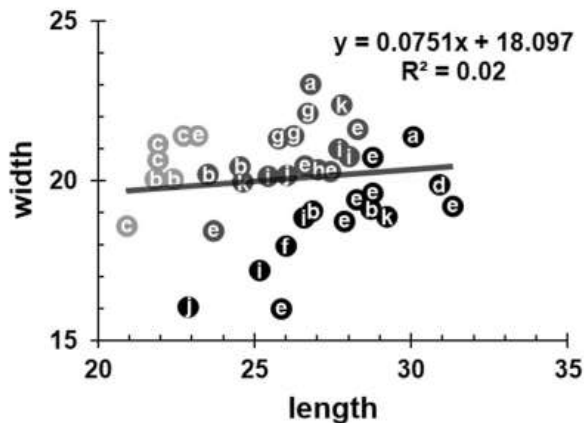


Fig. 7 Distribution of subspheroidal (light grey), ovoidal (dark grey), and ellipsoidal (black) oocysts of *Eimeria patagioenasae* in linear regression ($n=40$). The letters indicate the following combinations of characteristic features (morphotypes): a, oocyst wall smooth and without associated morphological structures; b, with outer veil/rough wall; c, with micropyle; d, with lateral micropyle; e, with micropyle cap and micropyle; f, with outer veil/rough wall and micropyle; g, with micropyle and lateral micropyle; h, with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle; i, with outer veil/rough wall, micropyle and lateral micropyle; j, with micropyle cap, micropyle and lateral micropyle; and k, with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle and lateral micropyle

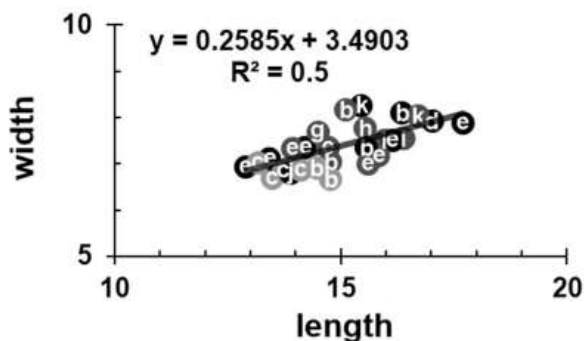


Fig. 8 Distribution of sporocysts in subspheroidal (light grey), ovoidal (dark grey), and ellipsoidal (black) oocysts of *Eimeria patagioenasae* in linear regression ($n=27$). The letters indicate the following combinations of characteristic features (morphotypes): b, with outer veil/rough wall; c, with micropyle; d, with lateral micropyle; e, with micropyle cap and micropyle; g, with micropyle and lateral micropyle; h, with outer veil/rough wall, micropyle cap, and micropyle; i, with outer veil/rough wall, micropyle, and lateral micropyle; j, with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; k, with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle

Polymorphism is a population characteristic in which a single species has variations in its shape, size, and other characteristic features; therefore, a variation at the species level (intraspecific) (Gardner and Duszynski 1990; Wiens 1999; Amorim 2002; Berto and Lopes 2020). In population

genetics, the term polymorphism indicates a transience of alleles where two or more alleles from the same *locus* coexist; that is, polymorphism is the phenotypic/genotypic variations intrinsic to a species (Amorim 2002). However, in addition to this intrinsic polymorphism of the species, other factors may be associated. From the reviews by Fayer (1980) to Berto and Lopes (2020), several authors indicate that stress, nutrition and immunity of the host, phenotypic plasticity, infective dose, time of oocyst shedding in the patent period, anticoccidial drugs, abiotic factors associated with sporulation, and measurement methodology may be related to oocyst polymorphism. In this context, the following works are noteworthy: Duszynski (1971) reports an increase in the size of oocysts of *Eimeria separata* Becker & Hall, 1931, during the patent period; Parker and Duszynski (1986) identified an extreme polymorphism in oocysts of *Eimeria reichenowi* Yakimoff & Matschoulsky, 1935, later related to a phenotypic plasticity (Gardner and Duszynski 1990), which is defined as the ability of a single genotype to exhibit a range of phenotypes in response to variation in the environment (Pigliucci 2001); Fayer (1980) and Berto and Lopes (2020) synthesize that the different wild, anthropized and confinement environments of the hosts can interfere with the morphometry and the number of oocysts shedding, which are reported by Gomez et al. (1982) and Berto et al. (2008); Greif et al. (1996) found that resistance to anticoccidial drugs can generate polymorphism; and, finally, Berto et al. (2014) demonstrate that in coccidian species with oocysts with an L/W ratio greater than 1.1 (generally ovoidal/ellipsoidal shape), the observation of polymorphism is more common since the dimensional measurement of the oocyst (which is three-dimensional) is inaccurate when the oocysts are not in strictly longitudinal position, while in subspheroidal oocysts (L/W ratio of 1.0–1.1), this inaccuracy is greatly attenuated. In the context of the latter case, all ovoidal and ellipsoidal oocysts measured in the current work were carefully checked and measured in the longitudinal position, reducing this morphometric inaccuracy as much as possible.

From an evolutionary point of view, polymorphism may represent an ongoing speciation process, which Wiens (1999) names macroevolution, that is, the gradual process in which certain taxonomic characters can be eliminated or incorporated in the formation of a new species. Wiens (1999) also asserts that polymorphism can have a profound impact on species delimitation and, consequently, on taxonomic and phylogenetic studies; therefore, polymorphic characters cannot be neglected. Some studies report this polymorphic process of speciation in eimeriid coccidians: Gardner and Duszynski (1990) observed polymorphism in oocysts of *Eimeria opimi* Lambert, Gardner & Duszynski, 1988 in different species of tuco-tucos *Ctenomys* spp. in Bolivia, which was associated with a process of speciation



Fig. 9 Phylogenetic relationship of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* inferred by Bayesian analysis for a locus (COIBF1) within *cox1* gene of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from Maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior

probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed. Morphotypes “subspheroidal-c”, “ovoidal-e” and “ellipsoidal-i” refer to oocysts subspheroidal with micropyle; ovoidal with micropyle cap and micropyle; and ellipsoidal with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle, respectively



Fig. 10 Phylogenetic relationship of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* inferred by Bayesian analysis for a locus (MACOIII) that partially covers the *cox3* gene of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and

posterior probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed. Morphotypes “subspheroidal-c”, “ellipsoidal-k” and “ellipsoidal-i” refer to oocysts subspheroidal with micropyle; ellipsoidal with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; and ellipsoidal with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle, respectively

and host adaptation; Silva-Carvalho et al. (2020) observed morphological and genotypic variations in *Isospora parnaitaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 from different antbird species, which were

also associated with the process of adaptive speciation to different host species. In this context, Berto and Lopes (2020) summarize that the intense genetic recombinations at certain moments of speciation, especially in adapting



Fig. 11 Phylogenetic relationship of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* inferred by Bayesian analysis for a locus (MAVCOXI) within *cox1* gene of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior

probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed. Morphotypes “ellipsoidal-k” and “ellipsoidal-i” refer to oocysts ellipsoidal with outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; and ellipsoidal with micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle; respectively



Fig. 12 Phylogenetic relationship of *Eimeria patagioenasae* from plumbeous pigeons *Patagioenas plumbea* inferred by Bayesian analysis for a locus (MARI) which occupies fragments of small and large subunits rDNA of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from maximum likelihood analysis/

posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed. Morphotype “ellipsoidal-k” refers to an oocyst ellipsoidal with an outer veil/rough wall, micropyle cap, micropyle, and lateral micropyle

to new hosts, should generate random taxonomic characters depending on whether the genes are present/active or not. Therefore, the possibility that *E. patagioenasae* is in a polymorphic process of speciation, and host adaptation is prominent. The oocysts of *E. patagioenasae* share some typical taxonomic characteristics with *E. ferreirai*, such as the size and micropyle in the longitudinal position of the

oocyst, in addition to *E. labbeana*, which has longitudinal and lateral micropyles. Furthermore, *E. ferreirai* has the same type locality as *E. patagioenasae*, having its hosts sympatric in the Itatiaia National Park in southeastern Brazil. Possibly *E. patagioenasae* is speciating in an adaptation to *P. plumbea* from an ancestral eimerian common to *Eimeria* spp. of Columbiformes, in a process where many

genetic recombinations occur leading to the observed phenotypic polymorphism.

The molecular results confirmed the definition of a single species in the oocysts (of different morphotypes) shed by the plumbeous pigeons *P. plumbea*, since small genetic divergences were observed only in the MACOIII *locus*, while for the COIBF1 and MAVCOXII *loci*, the sequences were identical between the different morphotypes. It is noteworthy that the highest molecular divergence of 0.9% (5 nt; 561/566 identities) at the MACOIII *locus* was between oocysts morphologically similar (ellipsoid oocysts with more than three characteristic features associated with the oocyst wall), compared to a molecular divergence of 0.2% (1 nt; 565/566 identities) between the oocysts most morphologically dissimilar (subespheroidal and ellipsoidal oocysts largely distinct in the oocyst wall). As such, it is understood that the small molecular divergences detected at the MACOIII *locus* were not associated with the different morphotypes, reinforcing the decision of the current work to identify the different morphotypes as intraspecific variations of *E. patagioenasae*. At the same time, the nucleotide substitutions at the MACOIII *locus* show some genetic polymorphism, which, despite not having been directly correlated with specific morphotypes, emphasizes that the morphological and morphometric polymorphism in the oocysts must be intrinsic to the species or related to the process of speciation/host adaptation and not related to the previously mentioned external factors.

In contrast to current work, Hafeez et al. (2014) named two *Isospora* spp., morphologically and morphometrically undifferentiated, based on a molecular divergence of 1.4% (11 nt) at a 761-nt *locus* of the *cox1* gene. The molecular divergence obtained by Hafeez et al. (2014) was reasonably close to that of the current study (1.4% vs. 0.9%), but it is important to emphasize that these are distinct and non-overlapping *loci* in mitochondrial DNA. The *locus* used in Hafeez et al. (2014) was positioned between ~1700 and 2500 nt of mitochondrial DNA, which partially overlaps the COIBF1 and MAVCOXII *loci*, whereby 100% identity was obtained between the morphotypes of the current work (Fig. 1).

There are only five sequences of *loci* of the *cox1* gene from *Eimeria* spp. of Columbiformes deposited in GenBank. The first deposits were from Yang et al. (2016) for *loci* of the small (18S) and large (28S) subunit ribosomal RNA and *cox1* genes for an *Eimeria* sp. recovered from *Columba livia* Gmelin, 1789, in Australia. *Eimeria columbinae* was sequenced for the COIBF1 *locus* and a *locus* of the 18S gene (Ortúzar-Ferreira et al. 2020). *Eimeria ferreirai* and *E. chalcopterae* were described with deposits of sequences in the *cox1* gene and also 18 s and 28 s genes for *E. chalcopterae* (Yang et al. 2020; Oliveira et al. 2020). *Eimeria labbeana* was morphologically supplemented and had sequences from the COIBF1 *locus* and a *locus* of

18S deposited (Oliveira et al. 2021). Finally, Taroda et al. (2020) deposited sequences of a *locus* at the *cox1* gene from eimerian oocysts of eared doves *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) in Brazil, but no species were morphologically identified in this work. Thus, *E. patagioenasae* becomes the fifth nominal species recorded from Columbiformes to have a molecular identification.

Molecular analyses of *loci* of the 18S and 28S nuclear genes were intended in the current study, but the amplification was not successful, possibly due to the DNA extraction methodology from an individual oocyst that provides few copies of nuclear DNA, unlike the greater amount of mitochondrial DNA available in each sporozoite/oocyst (Dolnik et al. 2009). Anyway, the use of *loci* of the 18S and 28S genes is more suitable for the study of deeper evolutionary events, whereas the mitochondrial genes have been considered the most suitable for species differentiation and detection of recent evolutionary events (Ogedengbe et al. 2011, 2015); therefore, they are more consistent with the objectives of the current study.

The phylogenetic analyses were inconclusive because they did not form monophyletic groups with *Eimeria* spp. from Columbiformes, which would be an expected result for the COIBF1 *locus*, or because there are no sequences of eimerians from Columbiformes deposited for the same genic regions of the MACOIII, MAVCOXI, and MARI *loci*. In fact, the COIBF1 *locus*, despite being the most successful in amplification from an individual oocyst, has been shown to be unsuitable for phylogenetic analysis because it does not show results consistent with phylogenetic, morphological, or ecological hypotheses (Ortúzar-Ferreira et al. 2022). On the other hand, the MACOIII, MAVCOXI, and MARI *loci*, which have longer sequences and are in other regions of the mitochondrial DNA (Fig. 1), showed monophyletic groups associated with their respective host groups (Figs. 10, 11 and 12), proving to be *loci* with a promising future in phylogenetic studies when more eimerian coccidians are sequenced in these same genic regions. It is worth highlighting the MAVCOXI *locus*, which showed consistent and well-supported results in the phylogenetic tree (Fig. 11) and belongs to the *cox1* gene, which is considered one of the main genes for species delimitation in the so-called “barcode of life” (Ogedengbe et al. 2011).

In conclusion, the delimitation and description of species must be a detailed and multifactorial process, mainly in the case of extremely polymorphic species; in order to avoid misidentifications and invalid descriptions, at the same time it must present with greater comprehensibility and specificities the characteristics inherent to a species (Dayrat 2005). In this context, “Integrative Taxonomy” is the name given to the use of multiple complementary tools that allow analyzing and inferring about a biological material to describe biodiversity (Dayrat 2005; Fujita et al. 2012; Hoberg et al.

2015). In the case of the identification of eimeriid coccidian species, the multifactorial approach of the analysis of morphology, morphometric statistics, molecular and phylogenetic studies, and considerations on the biology and ecology of the parasite and the host (e.g., specificity, sites of infection, and ecological niches) express the Integrative Taxonomy (Dayrat 2005; Berto et al. 2014; 2023; Berto and Lopes 2020). Thus, the multifactorial approach of the current work supported the definition of the polymorphic oocysts shed from *P. plumbea* as a single species, *E. patagioenasae*, making this the twenty-second eimerian description from Columbiformes.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08045-5>.

Acknowledgements We are thankful to the staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinators Dr Léo Nascimento (previous) and Marcelo Souza Motta (current), who allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Author contribution The study was designed by MSO, VML and BPB. Field work was performed by CNO-F, LASA and BPB. Laboratory procedures for maintenance, recovery, measurements, photomicrographs and isolation of oocysts were performed by CNO-F and LASA. Primers for amplification of new *loci* were designed by MSO and VML. DNA extraction, amplification and sequencing were performed by MSO, ERM and VML. New sequences were deposited in GenBank by VML. Morphometric statistical and phylogenetic analyses, figure editing and line drawings were performed by BPB. The manuscript was written by CNO-F, MSO and BPB and subsequently revised by all other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). CNO-F and LASA have scholarships from CAPES (Grant/Award Number: 001). MSO has a postdoctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). VML has a fellowship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-27/211.566/2021). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 302345/2022-1) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/200.565/2023).

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval Field-collecting permits were issued by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)), through the Biodiversity Authorization and Information System (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)) under license number 70132, and the Animal Ethics Committee (Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)) of the University of Grande Rio (Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)) under protocol number 021/2019. Banding permits and metal rings were issued by CEMAVE/ICMBio (Senior Ringer: BPB, registration 5967850). All applicable institutional, national, and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2000) *Eimeria curvata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 95:53–55. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000100008>
- Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2003) A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. Acta Protozool 42:71–73
- Alyousif MS, Al-Shawa YR, Al-Asiri SS (2009) *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol 39:383–388
- Amorim DS (2002) Fundamentos de Sistemática Filogenética. Holos Editora, Ribeirão Preto
- Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (2008) Parasitic diseases of wild birds. Wiley-Blackwell, Singapore
- Ayres M, Ayres M, Ayres DL, Santos AAS (2007) BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas. Mamirauá, Belém
- Ball SJ, Daszak P, Swinnerton KR, Jones CG, Snow KR (2012) A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. Afr Zool 47:369–372
- Bandyopadhyay PK, Bhakta JN, Shukla R (2006) A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoea) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). Zoos Print J 21:2386–2387
- Berto BP, Lopes CWG (2020) Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. J Parasitol 106:707–713. <https://doi.org/10.1645/19-148>
- Berto BP, Flausino W, Almeida CRR, Lopes CWG (2008) Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese, *Anser anser* L., 1758 from two distinct sites. Rev Bras Med Vet 30:215–219
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, Lopes CWG (2011) Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). Syst Parasitol 80:159–204. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Rev Bras Parasitol Vet 23:1–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Berto BP, Machado EL, Hossotani CMDS, Beretta BMS, Silva DRR, Nakamura AA, Meireles MV (2023) Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): worldwide distribution, morphological and molecular characterization, revaluations and establishment of junior synonyms. Syst Parasitol 100:245–259. <https://doi.org/10.1007/s11230-023-10084-6>
- BirdLife International (2023) Species factsheet: *Patagioenas plumbea*. <http://www.birdlife.org>. Accessed 14 April 2023
- Casas MC, Duszynski DW, Zalles LM (1995) Three new eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from Eastern Bolivia and Southern Venezuela. J Parasitol 81:247–251. <https://doi.org/10.2307/3283928>

- Chatterjee DK, Ray HN (1969) *Eimeria kapotei* n. sp., from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. Proc 24th Indian Sci Cong 56:512
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc 85:407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- Dolnik O (2006) The relative stability of chronic *Isoospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. Parasitol Res 100:155–160. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. J Parasitol 95:169–174. <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Duszynski DW (1971) Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. J Parasitol 57:948–952. <https://doi.org/10.2307/3277841>
- Duszynski DW (2021) Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. Folia Parasitol 68:001. <https://doi.org/10.14411/fp.2021.001>
- Duszynski DW, Wilber PG (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. J Parasitol 83:333–336. <https://doi.org/10.2307/3284470>
- Fayer R (1980) Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. Vet Parasitol 6:75–103. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(80\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(80)90039-4)
- Flausino G, Lopes CWG, Teixeira-Fillho WL, Furtado TT, McIntosh D, Berto BP (2014) Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs (*Cavia porcellus*). Acta Protozool 53:269–276. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.14.024.1999>
- Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. Trends Ecol Evol 27:480–488. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.04.012>
- Gardner SL, Duszynski DW (1990) Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. J Parasitology 76:805–811. <https://doi.org/10.2307/3282798>
- Golemansky V (1976) Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. Acta Protozool 15:399–404
- Gomez FM, Navarrete I, Rodriguez RL (1982) Influence of environmental factors on different populations of *Isoospora lacazei* Labbe 1893 (Protozoa: Apicomplexa). Rev Iber Parasitol 42:185–196
- Greif G, Stephan B, Haberkorn A (1996) Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. Parasitol Res 82:706–714. <https://doi.org/10.1007/s004360050189>
- Hafeez MA, Stasiak I, Delnatte P, El-Sherry S, Smith DA, Barta JR (2014) Description of two new *Isoospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). Parasitol Res 113:3287–3297. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3992-8>
- Hoberg EP, Agosta SJ, Boeger WA, Brooks DR (2015) An integrated parasitology: revealing the elephant through tradition and invention. Trends Parasitol 31:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.005>
- ICMBIO (2023) Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Accessed 14 April 2023
- ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of Articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. Bull Zool Nomencl 69:161–169. <https://doi.org/10.21805/bzn.v69i3.a8.161>
- Jamriška J, Modrý D (2012) A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae). Acta Protozool 51:329–333. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.12.026.0786>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Bio Evol 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- McQuiston TE (1991) *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaidura galapagoensis*). Trans Am Microsc Soc 110:178–181. <https://doi.org/10.2307/3226755>
- Mello DJM, Mello GJM, Mallet-Rodrigues F, Lima LM (2020) Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação. Editora Irmãos Mello, Rio de Janeiro
- Mitra AN, Das-Gupta M (1937) On a species of *Eimeria* (Coccidia-Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. Proc 24th Indian Sci Cong 24:291
- Nieschulz O (1935) Ueber Kokzidien der Haustauben. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg 134:390–393
- Norton CC, Joyner LP (1981) *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. Parasitology 83:269–279. <https://doi.org/10.1017/S00318200085280>
- Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). Int J Parasitol 41:843–850. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>
- Ogedengbe JD, Ogedengbe ME, Hafeez MA, Barta JR (2015) Molecular phylogenetics of eimeriid coccidia (Eimeriidae, Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata): a preliminary multi-gene and multi-genome approach. Parasitol Res 114:4149–4160. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4646-1>
- Oliveira MS, Genovez-Oliveira JL, Ortúzar-Ferreira CN, Maronezi C, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Berto BP (2020) *Eimeria ferreirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil. Zootaxa 4821:148–160. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4821.1.8>
- Oliveira MS, Ramilo DW, Mello ER, Cardozo SV, Caetano I, Brazio E, Fonseca IP, Oliveira AA, Lima VM, Berto BP (2021) Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal. Parasitol Res 120:3569–3580. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07300-x>
- Ortúzar-Ferreira CN, Oliveira MS, Genovez-Oliveira JL, Franco HA, Thode-Filho S, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Coccidia of Columbiformes of the world: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. Parasitol Res 119:329–333. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06514-4>
- Ortúzar-Ferreira CN, Mello ER, Melo JO, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2021) Redescription and molecular identification of *Isoospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. Syst Parasitol 98:333–341. <https://doi.org/10.1007/s11230-021-09981-5>
- Ortúzar-Ferreira CN, Andrade LAS, Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Mello ER, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2022) Molecular identification of *Isoospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil. Zootaxa 5168:83–91

- Parker BB, Duszynski DW (1986) Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *J Parasitol* 72:602–604. <https://doi.org/10.2307/3281518>
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Pinto C (1928) Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa). *C R Seances Soc Biol* 98:564–565
- Ray DK (1952) On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae* n. sp., from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). *J Parasitol* 38:546–547
- Ridgely RS, Gwynne JA, Tudor G, Argel M (2015) *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*. Horizonte, São Paulo
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542
- Sampaio IBM (2002) *Estatística aplicada à experimentação animal*. FEP MVZ Editora, Belo Horizonte
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro
- Silva-Carvalho LM, Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. *Syst Parasitol* 97:847–855. <https://doi.org/10.1007/s11230-020-09940-6>
- Taroda A, Barros LD, Seixas M, Cardim ST, Sasse JP, Minutti AP, Vidotto O, Garcia JL (2020) First molecular detection of *Eimeria* spp. in eared doves (*Zenaidura macroura*) from Brazil. *Semin: Ciências Agrárias* 41:1259–1266
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2017) *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Varghese T (1978) *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the greenwinged ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea. *J Parasitol* 64:312–314. <https://doi.org/10.2307/3279680>
- Varghese T (1980) Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. *Parasitol* 80:183–187. <https://doi.org/10.1017/S003118200000640>
- Wiens JJ (1999) Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annu Rev Ecol Syst* 30:327–362. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.327>
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst Parasitol* 76:69–76. <https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>
- Yabsley MJ, Bailey K, Adams HC (2015) A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the mourning dove, *Zenaidura macroura* (Columbiformes: Columbidae). *Comp Parasitol* 82:231–234. <https://doi.org/10.1654/4769.1>
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. *Exp Parasitol* 166:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.009>
- Yang R, Brice B, Berto BP, Ryan UM (2020) Morphological and genetic characterization of *Eimeria chalcopterae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in a common bronzewing pigeon (*Phaps chalcoptera*) (Latham, 1790) in Western Australia. *Parasitol Res* 119:3729–3737. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06844-8>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.