

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

TESE

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES
SILVESTRES DA ILHA DA MARAMBAIA: IDENTIFICAÇÃO DE
NOVAS ESPÉCIES, GENÓTIPOS, HOSPEDEIROS, LOCALIDADES E
PSEUDOPARASITISMO**

LUCAS DE ASSIS SILVA ANDRADE

Seropédica, RJ

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DA
ILHA DA MARAMBAIA: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES, GENÓTIPOS,
HOSPEDEIROS, LOCALIDADES E PSEUDOPARASITISMO**

LUCAS DE ASSIS SILVA ANDRADE

Sob a orientação do Professor

Dr. Bruno Pereira Berto

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em **Biologia Animal**,
área de concentração em **Biodiversidade
Animal**.

Seropédica, RJ

Outubro de 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)

A554d Andrade, Lucas de Assis Silva, 16/10/1992-
Diversidade e distribuição de coccídios de aves silvestres da Ilha da Marambaia: identificação de novas espécies, genótipos, hospedeiros, localidades e pseudoparasitismo / Lucas de Assis Silva Andrade. - Petrópolis, 2023.
157 f.: il.

Orientador: Bruno Pereira Berto.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Biologia Animal, 2023.

1. Coccídios. 2. Morfologia. 3. Sequenciamento. 4. Taxonomia. 5. Aves silvestres. I. Berto, Bruno Pereira , 13/07/1984-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Biologia Animal III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 1410 / 2023 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.080826/2023-71

Seropédica-RJ, 08 de dezembro de 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

LUCAS DE ASSIS SILVA ANDRADE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor(a) em Ciências**, no Curso de pós-graduação em **BIOLOGIA ANIMAL**, área de concentração em **BIODIVERSIDADE ANIMAL**.

TESE APROVADA EM 30/10/2023

(Assinado digitalmente em 08/12/2023 09:27)

BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 1971595

(Assinado digitalmente em 12/12/2023 11:28)

ILDEMAR FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 387289

(Assinado digitalmente em 08/12/2023 15:45)

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 152.850.237-00

(Assinado digitalmente em 13/12/2023 13:35)

SERGIAN VIANNA CARDOZO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 082.157.777-83

(Assinado digitalmente em 08/12/2023 09:35)

LUCIO ANDRÉ VIANA DIAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 528.742.651-87

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1410**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **08/12/2023** e o código de verificação: **693ece359f**

DEDICATÓRIA

A minha vó, Leci Mourão (*in memoriam*), pela sua dedicação em criação dos seus filhos e netos. E aos meus pais, por todo amor e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, essa energia que rege o universo e possui as respostas de todos os mistérios.

Sou eternamente grato à minha família, meu tesouro, que estiveram presentes em todos os meus momentos, bons e ruins, sempre me apoiando. Meus pais cumpriram com maestria a responsabilidade de transmitir seus valores pessoais para a formação de um cidadão. Minha mãe, Maria da Penha, e meu pai, Luiz Carlos, se dedicaram ao máximo para me oferecer uma educação de qualidade e sempre deixaram claro que a maior herança que poderiam me deixar era a educação. Meu irmão, Francisco de Assis, que, além de tudo, é um grande amigo, e esteve sempre ao meu lado. Agradeço também à minha querida namorada, Daiana Souza, que conheci através da Pós-Graduação e que agora já faz parte da minha família. Seu companheirismo e amor foi fundamental nessa fase da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu grupo de pesquisa do LABICOC, em especial ao meu orientador, Dr. Bruno Berto, por todos os ensinamentos na área da Parasitologia. O Bruno, ou professor, sempre esteve disponível para me ajudar no que fosse preciso, desde dúvidas acadêmicas, saídas de campo a conselhos pessoais. Agradeço também à parceria de todos os colegas do laboratório, sem vocês, essa trajetória teria sido muito mais difícil.

Agradeço também ao professor Dr. Marcelo Souza, que nos auxiliou em todo o processo de convênio com o Centro de Avaliação da Ilha do Marambaia (CADIM) da Marinha do Brasil e esteve sempre disponível para nos ajudar. Agradeço também ao CADIM por oferecer toda a estrutura possível para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos doutores (as) Ildemar Ferreira, Viviane Lima, Mariana Oliveira, Sergian Cardozo, Lúcio Dias e Hermes Luz, que prontamente aceitaram participar da banca de defesa e contribuir com seus valiosos conhecimentos.

Agradeço à CAPES e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela concessão da bolsa e pela estrutura acadêmica oferecida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Não posso deixar de agradecer à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, uma instituição que oferece ensino público, gratuito e de qualidade. Foi minha morada durante dez anos da minha vida, desde a graduação até o doutorado. Através dela, adquiri conhecimentos acadêmicos, científicos além de formação como pessoa. Agradeço a todos os professores,

técnicos, funcionários e colegas que fizeram parte da minha formação de alguma forma. Agradeço também ao Alojamento da Pós-Graduação, local que me proporcionou não só a permanência em Seropédica, mas também a construção de grandes amizades, contatos com diferentes culturas e experiências de vida.

BIOGRAFIA

LUCAS DE ASSIS SILVA ANDRADE, filho de Luiz Carlos de Assis Andrade e Maria da Penha de Rodrigues da Silva de Assis Andrade, nasceu em 16 de outubro de 1992 no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.

Iniciou sua formação profissional em 2012, ingressando no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). No segundo semestre de 2012, interrompeu seu curso na UENF para iniciar os estudos no mesmo curso na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, RJ. Foi estagiário no Laboratório de Ornitologia do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, sob orientação do Prof. Dr. Ildemar Ferreira. Foi aluno de Iniciação Científica. O primeiro projeto abordou os comportamentos interespecíficos de duas espécies de cucos, *Guira guira* e *Crotophaga ani*. O segundo projeto abordou o comportamento reprodutivo da lavadeira-mascarada (*Fluvicula nengeta*, Aves - Tyrannidae) em fragmentos de Mata Atlântica no campus da UFRRJ e no município de Piraí, RJ. Esse segundo tema culminou na produção de sua monografia.

Após graduar-se como Bacharel em Ciências Biológicas em 2017, ingressou no ano seguinte no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, em nível de mestrado na UFRRJ, sob orientação novamente do Prof. Dr. Ildemar Ferreira, realizando pesquisa sobre riqueza, composição e conservação da avifauna de uma RPPN em Itaguaí, RJ. Concluiu o mestrado em 2019 e, no mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da mesma instituição para cursar o Doutorado. Desta vez, sob orientação do professor Dr. Bruno Pereira Berto, realizando sua pesquisa em Taxonomia e Ecologia de Coccídios na Ilha da Marambaia, RJ.

" Caminhante, são tuas pegadas

o caminho e nada mais;

caminhante, não há caminho,

se faz caminho ao andar”

Cantares (Antonio Machado)

RESUMO

TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DA ILHA DA MARAMBAIA: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES, GENÓTIPOS, HOSPEDEIROS, LOCALIDADES E PSEUDOPARASITISMO. 2020. 81p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Mata Atlântica é um dos biomas prioritários do mundo para ser restaurado. Aproximadamente 70% da população brasileira depende dos serviços ecossistêmicos desse bioma, porém, ele encontra-se em alto grau de ameaça. A Ilha da Marambaia é uma área conservada deste bioma, situada no litoral da Costa Verde, ao sul do Estado do Rio de Janeiro. O conhecimento da ecologia das aves silvestres é de extrema importância para conservação da Mata Atlântica e, por conseguinte, da Ilha da Marambaia. Aves de vida livre coexistem com inúmeros parasitas em ambientes conservados, porém tendem a sofrer com parasitoses, principalmente a coccidiose, quando em ambientes impactados. A coccidiose é uma doença causada por cromistas coccídios, os quais formam um grupo taxonômico diversificado e complexo. A ordem Passeriformes é majoritariamente parasitada por coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria*, os quais pertencem a família Eimeriidae. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo identificar (de forma morfológica e molecular) e quantificar coccídios parasitas de aves silvestres de diferentes espécies, famílias e localidades dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia. Neste sentido, esta tese apresenta uma revisão da literatura científica nos temas de ecologia e taxonomia de coccídios de aves silvestres, e nos capítulos I, II e III, abordamos identificações morfológicas e moleculares de coccídios de aves silvestres capturadas dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia, incluindo uma nova espécie nomeada como *Isospora juruviae* Andrade & Berto, 2023. Finalmente, o capítulo IV abrange o levantamento e monitoramento das identificações e densidades dos coccídios nas diferentes ordens e famílias de aves silvestres capturadas dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia no período de 2019 até 2023.

Palavras chave: oocistos, coccídios, *Isospora*, morfologia, sequenciamento, Passeriformes.

ABSTRACT

TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIA OF WILD BIRDS FROM MARAMBAIA ISLAND: IDENTIFICATION OF NEW SPECIES, GENOTYPES, HOSTS, LOCALITIES AND PSEUDOPARASITISM. 2020. 81p. Thesis (Postgraduate Program in Animal Biology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The Atlantic Forest is one of the world's priority biomes for restoration. Approximately 70% of the Brazilian population depends on the ecosystem services provided by this biome, but it is highly threatened and at risk. Marambaia Island is a protected area of this biome, located on the Costa Verde coast, south of the state of Rio de Janeiro. Knowledge of the ecology of wild birds is extremely important for the conservation of the Atlantic Forest and, by extension, Marambaia Island. Wild birds coexist with numerous parasites in protected environments, but they tend to suffer from parasites, especially coccidiosis, when they are in degraded environments. Coccidiosis is a disease caused by coccidia, which form a diverse and complex taxonomic group. The order Passeriformes is mainly parasitized by coccidia of the genera *Isospora* and *Eimeria*, which belong to the family Eimeriidae. In this context, the main objective of the present study was to identify (morphologically and molecularly) and quantify the parasitic coccidia of wild birds of different species, families and locations within and adjacent to Marambaia Island. In this sense, this thesis presents a review of the scientific literature on the topics of ecology and taxonomy of wild bird coccidia, and in chapters I, II and III, morphological and molecular identifications of wild bird coccidia captured in and around Marambaia Island, including a new species named *Isospora juruviarae* Andrade & Berto, 2023. Finally, Chapter IV covers the survey and monitoring of identifications and densities of coccidia in the different orders and families of wild birds captured in and around Marambaia Island in the period from 2019 to 2023.

Keywords: oocysts, coccidia, *Isospora*, morphology, sequencing, Passerines.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Morfologia comparativa de *Isospora coerebae* registrada em *Coereba flaveola* de diferentes localidades do Sudeste do Brasil.....38

CAPÍTULO III

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem para amplificação por PCR mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (cox1) e genes 18S de RNA ribossômico de subunidade pequena (18S).....51

Tabela 2. Morfologia comparativa de *Isospora spp.* registradas na Parvorder Corvida no Novo Mundo.....53

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Prevalência e densidade de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* em amostras fecais de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, organizados por ordem, família e espécie e período de coleta.....76

Tabela 2. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Columbidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....82

Tabela 3. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Icteridae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....83

Tabela 4. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Passeridae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....84

Tabela 5. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Thraupidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....86

Tabela 6. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Turdidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....88

Tabela 7. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Tyrannidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....89

Tabela 8. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Vireonidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....89

Tabela 9. Prevalência de coccídios dos gêneros Eimeria ou Isospora de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, em relação ao período de coleta de amostras fecais.....90

Tabela 10. Densidade de coccídios dos gêneros Eimeria ou Isospora de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, em relação ao período de coleta de amostras fecais.....91

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Mapa com a localização da Ilha da Marambaia. Extraído de CADIM (2022).....3

Figura 2. Ilustração do esquema do ciclo biológico de *Eimeria*. Extraído de Gardiner et al. (1998).....7

Figura 3. Desenho em linhas compostas de um oocisto esporulado de *Eimeria* sp. recuperado de um martim-pescador verde *Chloroceryle americana*. É possível observar a camada interna e externa da parede do oocisto; grânulo polar; Corpos Stieda e sub-Stieda; resíduo de esporocisto; e corpo refrátil. Barra de escala: 10 μm8

Figura 4. Desenho em linhas compostas de um oocisto esporulado de *Isospora basileuterusi* recuperado da pula-pula *Basileuterus culicivorus*. É possível observar a camada interna e externa da parede do oocisto; grânulo polar; Corpos Stieda e sub-Stieda; resíduo de esporocisto; corpos refráteis posterior e anterior. Barra de escala: 10 μm9

CAPÍTULO I

Figura 1. Espécimes de *C. americana*, (A) macho e (B) fêmea, capturados na Ilha da Marambaia, RJ.....20

Figura 2. Desenho de linhas (A) e fotomicrografias (B–E) de oocistos esporulados de *Eimeria* sp. recuperado de um martim-pescador-pequeno *Chloroceryle americana*. Observe o grânulo polar (pg); Stieda e corpos sub-Stieda (sb/ssb); resíduo de esporocisto (sr); e corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 μm23

Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap (1000 réplicas; apenas valores > 50%

mostrados) para junção de vizinhos e máxima probabilidade, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....26

CAPÍTULO II

Figura 1. Espécime de *Coereba flaveola* capturado na RPPN Porangaba, Itaguaí – RJ.....32

Figura 2. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isoospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2010, uma espécie de coccídio recuperada do cambacica *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) do Sudeste do Brasil. Observe o corpo refrátil posterior (prb), corpo cristalóide (cb), camada interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto, resíduo do esporocisto (sr) e os corpos de Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala = 10 µm.....36

Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap (1000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para junção de vizinhos e máxima probabilidade, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....39

Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI2 de espécies de coccídios. Os números nos nós mostram probabilidades posteriores sob a análise de Inferência Bayesiana/valores de bootstrap derivados da análise de Máxima Verossimilhança. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.....40

CAPÍTULO III

Figura 1. Espécime de *V. chivi* capturado na Ilha da Marambaia, RJ.....49

Figura 2. Desenho de linha composta do oocisto esporulado de *Isoospora juruviarae* de *Vireo. chivi* no Sudeste do Brasil. Barra de escala: 10 µm.....54

Figura 3. Fotomicrografias de *Isospora juruviae* recuperadas de *V. chivi* no Sudeste do Brasil. Observe a micrópila (m), núcleo (n), grânulos polares (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpo Stieda (sb) e corpos sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 µm.....58

Figura 4. Relação filogenética de *Isospora juruviae* de *V. chivi* 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 inferência de análise bayesiana. Somente suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.....58

Figura 5. Relação filogenética de *Isospora juruviae* de *V. chivi* inferida pela análise Bayesiana para um locus (JAV) dentro do gene *cox1* do genoma mitocôndrial. Os números nos nós mostram valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Apenas suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.....60

Figura 6. Relação filogenética de *Isospora juruviae* de *V. chivi* inferida pela análise Bayesiana para um locus (1NF) dentro do gene 18S do nuclear genoma. Os números nos nós mostram valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Apenas suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.....61

CAPITULO IV

Figura 1. Mapa com os pontos de coleta em diferentes fitofisionomias da Ilha da Marambaia, RJ. Fonte: Google Earth.....69

Figura 2. Redes de neblina para captura de aves silvestre na Ilha da Marambaia.....71

Figura 3. Fotografia e anilhamento de aves silvestres na Ilha da Marambaia.....72

Figura 4. Processamento para recuperação, observação e fotomicrografia (da esquerda para a direita) de oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.....73

Figura 5. Espécimes de aves capturados na Ilha da Marambaia, RJ. A. *Vireo chivi*; B. *Troglodytes musculus*; C. *Ramphocelus bresilia*; D. *Turdus rufiventris*; E. *Leptotila rufaxilla*; F. *Myiarchus ferox*; G. *Psarocolius decumanus*; H. *Passer domesticus*.....75

Figura 6. Representatividade das famílias de aves (azul) com suas respectivas prevalências de coccídios (laranja) (ambos em porcentagem) na Ilha da Marambaia, RJ.....79

Figura 7. Fotomicrografias de oocistos esporulados de coccídios identificados de amostras fecais de aves capturadas na Ilha da Marambaia, RJ: A. *Isospora cadimi* de *Ramphocelus bresilia*; B. *Isospora navarroi* de *R. bresilia*; C. *Isospora ramphoceli* de *R. bresilia*; D. *Isospora sepetibensis* de *R. bresilia*; E. *Isospora sepetibensis* de *Emberizoides herbicola*; F. *Isospora pitiguari* de *Vireo chivi*; G. *Isospora juruviae* de *V. chivi*; H. *Isospora graceannae* de *Molothrus bonariensis*; I. *Isospora spratti* de *Passer domesticus*; J. *Isospora fatiguei* de *P. domesticus*; K. *Isospora michaelbakeri* de *P. domesticus*; L. *Isospora gonnetae* de *P. domesticus*; M. *Isospora cetasiensis* de *Sicalis flaveola*; N. *Isospora massardi* de *Turdus albicollis*; O. *Isospora ferox* de *Myiarchus ferox*; P. *Eimeria ferreirai* de *Leptotila verreauxi*.
Magnificação de 1000x.....81

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Declaração de aprovação da CEUA

Anexo B. Autorização para atividades com finalidades científica SISBIO

Anexo C. Publicação referente ao capítulo I

Anexo D. Publicação referente ao capítulo II

Anexo E. Publicação referente ao capítulo III

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Parasitas.....	4
2.2. Os coccídios.....	5
2.2.1. Classificação.....	5
2.2.2. Ciclo biológico e morfologia.....	6
2.2.3. Transmissão e dispersão.....	9
2.2.4. Especificidade ao hospedeiro.....	10
2.2.5. Periodicidade da eliminação de oocistos.....	11
2.2.6. Coccídios como biomarcadores.....	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO I.....	18
1. RESUMO.....	18
2. INTRODUÇÃO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II.....	30
1. RESUMO.....	30
2. INTRODUÇÃO.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO III.....	47
1. RESUMO.....	47
2. INTRODUÇÃO.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4. RESULTADOS.....	51

5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPÍTULO IV.....	67
1. RESUMO.....	67
2. INTRODUÇÃO.....	67
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CONCLUSÃO GERAL.....	95
ANEXOS.....	96

INTRODUÇÃO GERAL

A variedade de vida no planeta, ou variação entre organismos e os sistemas ecológicos referem-se ao termo biodiversidade. Engloba as plantas, os animais, os microrganismos e os processos ecológicos em uma unidade funcional. Neste contexto, o Brasil ocupa posição de destaque dentre os países com maior biodiversidade por abrigar alguns dos biomas com a maior riqueza de espécies da fauna mundial, cerca de 20% do total do planeta, e também, com a mais alta taxa de endemismo. O território nacional é classificado como megadiverso, junto com outras 15 nações abrigam aproximadamente 70 % de toda biodiversidade da Terra.

Uma das formas de se evitar a perda dessa biodiversidade é estudando-a, buscando compreender quais os organismos existentes e quais são os impactos das atividades humanas sobre eles (FUJIHARA et al., 2009).

No meio a elevada biodiversidade de seres vivos encontrada nos diferentes biomas brasileiros, podemos destacar a classe das aves. Atualmente são registradas 1971 espécies de aves, dessas, 84% são residentes ou nidificam no território brasileiro. Ainda assim, muitas espécies ainda precisam ser descritas ou acrescidas de novas ocorrências. Destaca-se também o elevado número de aves endêmicas, um total de 293, colocando o Brasil na terceira colocação entre os países com mais espécies de aves endêmicas do mundo (PACHECO et al., 2021).

Dentre as diferentes funções ecológicas, as aves silvestres desempenham importante papel na manutenção da biodiversidade das comunidades florestais, tendo em vista que grande parte das espécies vegetais são dispersadas por agentes bióticos, e as aves, através da ornitocoria e da polinização de flores, representam parcela significativa nesse processo mutualístico (MARTINS et al., 2014).

Com relação as aves existentes na Mata Atlântica, esse grupo também possui elevada riqueza de táxons e endemismos, 891 espécies apresentam ocorrência regular no bioma, um dos maiores grupos de vertebrados presentes neste bioma, sendo que grande parte destas aves vivem em ambientes florestais. Ainda que a Mata Atlântica tenha um histórico considerável

de investigação ornitológica, o conhecimento sobre a avifauna deste bioma está distante de ser considerado suficiente (MOREIRA-LIMA, 2013).

Juntamente com o Cerrado, o bioma Mata Atlântica está relacionado na lista das 36 áreas mais importantes para preservar a biodiversidade do planeta (REZENDE et al., 2018). Em particular, a Mata Atlântica está entre as cinco primeiras colocadas na lista dos hotspots mundiais, pois, sua área remanescente é inferior a 8% da sua extensão original (SIMON et al., 2008). Grande parte desse ecossistema encontra-se fragmentado, envolto de áreas degradadas, urbanizadas e pouco protegidas.

Aproximadamente 70% da população brasileira dependem dos serviços ecossistêmicos desse bioma, porém, ele encontra-se em alto grau de ameaça e risco. De acordo com o Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, o total de desmatamento deste bioma, no período de 2020 a 2021, foi de 21.642 hectares, significando um aumento de 66% ao período de 2019 a 2020. A perda das matas equivale 59 hectares por dia ou 2,5 hectares por hora (SOS MA/IMPE, 2022).

Nestas áreas remanescentes de Mata Atlântica, destacam-se alguns fragmentos, os quais mantêm conservados os habitats e nicho ecológicos das espécies. A Ilha da Marambaia é um bom exemplo desses refúgios ambientais, ela está situada no litoral da Costa Verde, ao Sul do Estado do Rio de Janeiro, próximos aos municípios Mangaratiba e Itaguaí, na entrada da Baía de Sepetiba (Figura 1.). A ilha é considerada uma área de preservação ambiental e de segurança nacional, ocupada pelo Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais e, embora antropizada, abriga uma grande biodiversidade de aves que representam uma amostragem das espécies observadas nos biomas de Mata Atlântica, Restinga e Manguezal. A entrada na Ilha da Marambaia é controlada pelo Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais, o qual possui, dentre as outras muitas funções, a proteção ecológica da ilha e o fornecimento recursos e instalações para pesquisa científica (CADIM, 2022).

Neste contexto, surge a importância do conhecimento da ecologia das aves silvestres, as quais têm extrema importância na conservação da Ilha da Marambaia (BERTO & LOPES, 2013). O estudo da distribuição e densidade dos ectoparasitas e enteroparasitas das aves silvestres capturadas em diferentes localidades e períodos na Ilha da Marambaia pode evidenciar padrões de prevalências e densidades específicas associadas com determinados

aspectos dos hospedeiros e ambientes, como por exemplo hábitos alimentares e nichos ecológicos.



Figura 1. Mapa com a localização da Ilha da Marambaia. Extraído de CADIM (2022).

1. OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES

O presente estudo tem por objetivo, investigar as relações parasitárias que ocorrem entre aves silvestres de diferentes espécies e os coccídios, através da identificação (morfológica e molecular) e quantificação dos oocistos, em localidades dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia.

Os objetivos específicos são: (1) Isolar coccídios de amostras fecais de diferentes espécies de aves silvestres e caracteriza-los morfológicamente e molecularmente; (2) Avaliar e/ou comprovar a distribuição e dispersão de determinadas espécies de coccídios, através do registro de novos de hospedeiros e/ou localidades, além do pseudoparasitismo associado a dispersão mecânica de oocistos; e (3) Avaliar a densidade das populações de coccídios através da quantificação de seus oocistos obtidos de amostras fecais de diferentes ordens, famílias e espécies de aves silvestres.

Neste sentido, esta tese apresenta uma revisão da literatura científica sobre coccídios de aves silvestres, e nos capítulos I, II e III, identificações morfológicas e moleculares de

coccídios de aves silvestres capturadas dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia, incluindo uma nova espécie nomeada como *Isospora juruviarae* Andrade & Berto, 2023. Finalmente, o capítulo IV abrange o levantamento e monitoramento das identificações e densidades dos coccídios nas diferentes ordem e famílias de aves silvestres capturadas dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia no período de 2019 até 2023.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Parasitas*

O conceito de relações parasitárias pode apresentar diferentes interpretações. Segundo Rey (2003), o parasitismo pode ser classificado como “relação ecológica, desenvolvida entre indivíduos de espécies diferentes, em que se estabelece associação íntima e duradoura e certo grau de dependência metabólica entre os parceiros”. Todavia, é importante salientar que a ocorrência de parasitismo não necessariamente resulta em consequências deletérias para o hospedeiro, a doença parasitária pode vir a ocorrer ou não em eventual momento na relação parasita-hospedeiro (FERREIRA & ARAÚJO, 2005).

Apesar do parasitismo ser uma relação ecológica comumente observada em diferentes táxons de animais, ainda existe uma extensa lacuna de conhecimento nesse campo de estudo. Um elevado número de parasitos de aves silvestres ainda não foi descrito taxonomicamente. Alguns grupos, como artrópodes ectoparasitas e protozoários hematófagos, são estudados amplamente, porém, outros como protozoários e helmintos ainda carecem de um maior aprofundamento de estudos (WOBSER, 2008).

Assim como outros animais silvestres, as aves são hospedeiras de diferentes grupos de endoparasitas e ectoparasitas, podendo inclusive serem parasitadas por mais de uma espécie de helmintos e coccídios. Em condições de normalidade imunológica, o hospedeiro mantém um nível de densidade parasitária aceitável, não comprometendo assim a sua saúde. Os coccídios tendem a parasitar aves de vida livre sem causar doença, obtendo equilíbrio entre as reinfecções e níveis saudáveis de imunidade nas aves (GILL & PAPERNA, 2008).

No entanto, a coccidiose é a forma patológica da interação do coccídio com seu hospedeiro, essa doença é importante causa de enterite nas aves, perda de peso, e em caso mais agudos podendo levar ao óbito (FREITAS et al. 2003; MAGALHÃES-MATOS et al., 2016). Aves em cativeiro estão mais susceptíveis a desenvolverem a coccidiose, principalmente quando os animais estão submetidos a intenso estresse e higiene precária. Com relação a biopirataria, Godoy e Matushima (2010), constataram que a maioria das mortes de pássaros brasileiros, apreendidas do tráfico ilegal em uma região de São Paulo, eram causadas pela coccidiose.

2.2. Os coccídios

2.2.1. Classificação

Os coccídios formam um grupo diversificado e complexo de parasitas, pertencem ao infrafiló Apicomplexa. A característica que melhor define este grupo de micro-organismos é o oocisto resistente, dotado de uma parede protetora (BELI et al. 2006).

A ordem Passeriformes é parasitada majoritariamente por coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria*, pertencentes à família Eimeriidae, são os gêneros mais relevantes encontrados nos estudos que abordam a parasitologia de aves. Os oocistos apresentam como características principais os esporocistos e esporozoítos, presença de corpos de Stieda e sub-Stieda (complexo de Stieda) e ciclo homógeno ou heterógeno facultativo (BERTO et al. 2014). Estes gêneros, segundo a classificação proposta por Ruggiero et al. (2015), pertencem ao Reino Chromista Cavalier-Smith, 1981, como observado a seguir:

Super-reino: Eukaryota Whittaker e Margulis, 1978

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafiló: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881

2.2.2. Ciclo biológico e morfologia

O ciclo evolutivo geral de desenvolvimento dos coccídios se divide em três fases: esporulação, infecção e merogonia e, por último, gametogonia e formação dos oocistos (TAYLOR *et al.*, 2017). Normalmente, *Isospora* e *Eimeria* infectam as células epiteliais do trato intestinal, o seu ciclo de desenvolvimento inicia-se pela fase assexuada, ou esquizogonia, através dos esporozoítos, que são liberados dos oocistos esporulados a luz do intestino. Logo após, são formados os esquizontes, unidade repleta de merozoítos. Processo chamado como merogonia. Este ciclo assexuado é seguido por uma fase sexual, a gametogonia, em que os merozoítos se desenvolvem em macrogametas ou microgamontes. Posteriormente, o macrogameta é fecundado por um microgameta. Corpos formadores de parede no macrogameta coalescem para formar uma parede ao redor do zigoto, que é então denominado um oocisto (BALL *et al.*, 1989) (Figura 1).

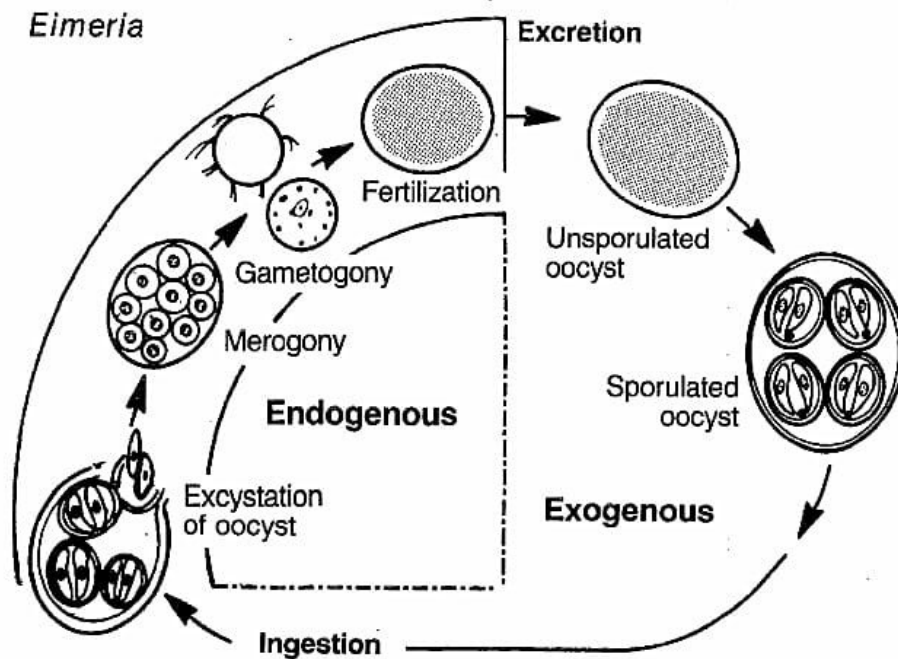


Figura 2: Ilustração do esquema do ciclo biológico de *Eimeria*. Extraído de Gardiner et al. (1998).

Tradicionalmente a estrutura do oocisto esporulado, em especial o número de esporocistos e esporozoítos, é utilizado como característica principal para diferenciar gêneros de coccídios. A família Eimeriidae possui 16 gêneros e aproximadamente 1.340 espécies descritas (TAYLOR et al. 2017). Outra estrutura importante na classificação, diferenciação e desenvolvimento dos oocistos é a sua parede, ela oferece ao coccídio proteção e resistência, e diferencia-se quanto ao formato, textura e coloração (GARDINER *et al.*, 1988; LEVINE, 1985). A parede do oocisto é constituída por duas camadas distintas, uma interna e outra externa, envolvida por uma membrana externa, essa por sua vez é fina e se perde após a saída do oocisto da célula (BELLI et al., 2006).

Segundo Duszynki e Wilber (1997), para descrever as espécies dos gêneros de *Isospora* e *Eimeria*, deve-se atentar em especial as seguintes características dos oocistos: diâmetros e índices morfométricos do oocisto e esporocisto; forma, textura e camadas da parede do oocisto; presença ou ausência de micrópila, capuz polar, resíduo e grânulo polar; corpos de Stieda, sub- Stieda e para-Stieda no esporocisto; presença ou ausência de copo refrátil e núcleo no esporozoíto.

Eimeria apresenta grande biodiversidade em Eucoccidiorida, classificação segundo Upton (2000), anterior a Ruggiero et al. (2015). São encontrados relatos de parasitismo em invertebrados e em todas as classes de vertebrados (BERTO et al. 2014). Oocistos de *Eimeria* spp. (Figura 2) são compostos por quatro esporocistos, contendo dois esporozoítos cada, suas paredes podem apresentar micrópila. Dentro do oocisto pode conter grânulo polar, resíduo do oocisto e resíduo do esporocisto, estas estruturas são originadas a partir da formação dos esporocistos e esporozoítos. Os esporozoítos geralmente apresentam formato de vírgula, podendo conter um ou dois corpos refráteis (LEVINE, 1985).

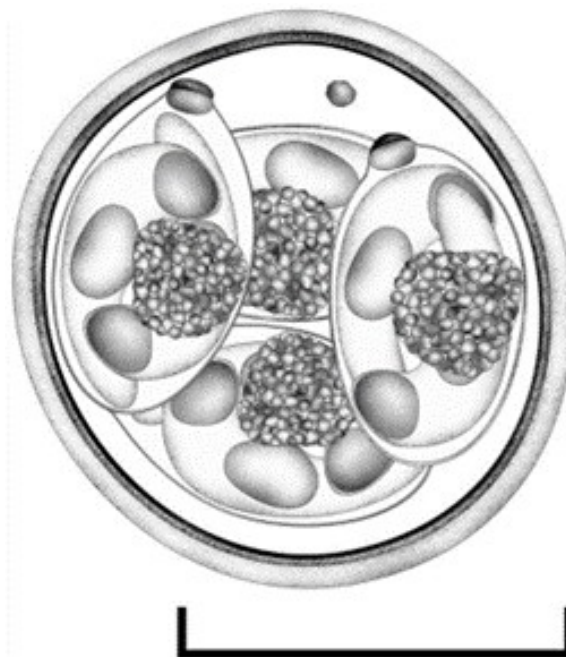


Figura 3: Desenho em linhas compostas de um oocisto esporulado de *Eimeria* sp. recuperado de um martim-pescador verde *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788). É possível observar a camada interna e externa da parede do oocisto; grânulo polar; Corpos Stieda e sub-Stieda; resíduo de esporocisto; e corpo refrátil. Barra de escala: 10 μ m. Extraído de Andrade et al. (2022).

Representantes do gênero *Isospora* são parasitas semelhantes em ciclo de vida geral e estrutura para espécies de *Eimeria*, mas diferem-se na estrutura do oocisto (GARDINER et al. 1988). Os oocistos desse gênero (Figura 3) são dispóricos tetrazóicos, ou seja, possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (LEVINE, 1985; GARCIA & BRUCKNER, 1997). Geralmente, o oocisto não possui corpo residual, de forma oposta que ocorre com as

espécies do gênero *Eimeria*. Oocistos de *Isospora* spp. possuem paredes mais uniformes e lisas, sendo necessário observar outras características tais como corpo de Stieda e sub-Stieda para identificar-se especificamente (BERENGUER, 2006; BERTO et al., 2014).



Figura 4. Desenho em linhas compostas de um oocisto esporulado de *Isospora basileuterusi* recuperado da pula-pula *Basileuterus culicivorus* (Deppe, 1830). É possível observar a camada interna e externa da parede do oocisto; grânulo polar; Corpos Stieda e sub-Stieda; resíduo de esporocisto; corpos refráteis posterior e anterior. Barra de escala: 10 μ m. Extraído de Mello et al. (2022).

2.2.3. Transmissão e dispersão

A forma como ocorre a transmissão dos coccídios se dá através dos hospedeiros que eliminam fezes contendo os oocistos, posteriormente, os oocistos ficam dispersos no ambiente, expostos a futura ingestão de um novo hospedeiro, que dará início a um novo ciclo de transmissão (DOLNIK et al. 2010).

Ao menos três fatores são preponderantes para elevar a intensidade de transmissão de coccídios em aves silvestres, são eles: a frequência que ocorrem as infecções, o número de oocistos esporulados presentes nas fezes e o estado de imunidade do hospedeiro, que pode variar de acordo com a sua idade (LONG 1982; DOLNIK 2002). Dolnik et al. (2010) ressaltam que esses fatores irão depender dos hábitos de forrageamento e alimentar dos

hospedeiros, destaca também que famílias de aves com hábitos alimentares onívoros, frugívoros e/ou granívoros apresentam maiores prevalência e densidade de coccídios. A hipótese que justifica esse fato é a forma como ocorre a transmissão dos coccídios, que é feco-oral, desta forma, as aves ao se alimentarem e defecarem na mesma região aumentam a probabilidade de ocorrência de transmissão. Enquanto que famílias de aves que apresentam o hábito de coletar alimentos durante o voo, como insetívoras, em geral apresentam baixa prevalência e densidade. Oliveira et al. (2017) também relaciona o hábito frugívoro a maior prevalência de coccídios eliminados de aves silvestres em áreas de fragmentos da Mata Atlântica.

2.2.4. Especificidade ao hospedeiro

Os estudos de Levine (1982) sobre coccídios trouxeram o conceito de especificidade de hospedeiro em Passeriformes a nível de gênero, fato importante para melhor compreensão desse grupo de parasitos, pois, até aquele momento, mais de 100 espécies de Passeriformes eram relatadas como hospedeiros de *Isospora lacazei* (LABBÉ, 1893), ocorrência bem improvável de uma única espécie poder parasitar tantos hospedeiros.

Os estudos mais recentes trazem o conceito de especificidade a nível intrafamiliar, propostos por Duszynski & Wilber (1997), esse trabalho sugere que os coccídios devem ter suas estruturas comparadas com espécies que se assemelham, morfometricamente e morfolologicamente, dentro da mesma família. Estudos que corroboram com essa especificidade (BERTO et al. 2010, 2011b; LOPES et al., 2013a, 2013b), encontraram espécies diferentes de aves, pertencentes da mesma família, porém com gêneros diferentes, sendo hospedeiras da mesma espécie de coccídio (BERTO et al., 2011a). Reconhece-se que as espécies do gênero *Isospora* têm maior especificidade aos pássaros, quando comparadas com aquelas do gênero *Eimeria*.

2.2.5. Periodicidade da eliminação de oocistos

As aves silvestres eliminam em suas fezes coccídios com ciclos circadianos bem definidos, ou seja, a variação da taxa de dispersão de oocistos está relacionada com os períodos do dia. Essa constatação foi observada inicialmente por Grulet et al. (1986a,1986b, 1986c), que consideram que a dessecação, devido a luz solar, contendo calor e radiação ultravioleta (UV), pode reduzir a taxa de sobrevivência dos oocistos. Desta forma, locais sombreados e úmidos fornecem as condições ideais para a conservação e esporulação dos oocistos (DOLNIK et al., 2010; MARTINAUD et al., 2009). De acordo com esses fatores, acredita-se que os picos de descarga de oocistos aconteçam no período da tarde como estratégia adaptativa para evitar a exposição a luz solar e consequente perda de água, pois garante assim que a maioria dos oocistos esporulem até a manhã do dia seguinte, quando um novo pico alimentar dos hospedeiros se inicia (LÓPEZ et al., 2007; MARTINAUD et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017). López et al. (2007), sugerem que os estudos que visam estimar a prevalência de coccídios em Passeriformes devem levar em conta, no processo metodológico, o ciclo circadiano destes parasitos.

Dolnik (1999), McQuiston (2000) e Misof (2004) sugeriram ainda uma segunda hipótese para descrever a dinâmica de eliminação oocistos de *Isospora* em Passeriformes, nela, os picos de atividade de alimentação das aves, início da manhã e final da tarde, estaria relacionado com o período de eliminação dos oocistos. Nesse sentido, as aves, ao compartilharem o mesmo local de alimentação, estariam mais susceptíveis a ingerirem os oocistos durante o forrageio.

2.2.6. Coccídios como biomarcadores

Como visto anteriormente, aves mantidas em cativeiro estão mais susceptíveis a desenvolverem a coccidiose, no entanto, em populações de aves de vida livre a densidade e prevalência de coccídios tendem a ser controlada. O monitoramento desses parâmetros pode servir como bioindicadores de impacto ambiental. Ainda pouco se sabe sobre taxas de infecção parasitárias em Passeriformes silvestres no Brasil (BERTO et al., 2011a).

Coccídios de *Eimeria* spp. e *Isospora* spp. são alguns dos parasitas mais comuns de pássaros, especialmente Passeriformes, no entanto, a coccidiose em aves selvagens imunocompetentes raramente é um problema significativo. Ambiente antropizados aumentam a probabilidade de redução da imunidade das aves, devido ao estresse causado pelo desmatamento, competição intraespecífica, redução da disponibilidade de alimentos, poluição, entre outros. Logo, impactos ambientais podem alterar as taxas de densidade e prevalência de coccídios em aves silvestres. Outro importante fator alterado pelas ações antrópicas é a morfometria dos oocistos, observa-se diferenças no padrão de tamanho dos oocistos em algumas espécies de coccídios, de acordo com o acometimento ou não do sistema imune do seu hospedeiro. Além de sinalizarem possíveis impactos ambientais antrópicos, o monitoramento da diversidade de coccídios em uma localidade pode indicar padrões biogeográficos, como migrações e dispersões de aves (BERTO & LOPES, 2020).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L. A. S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M. S.; CARDOZO, S. V.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I. BERTO, B. P. Observations on na *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*, v. 121, p. 1059–1063, 2022.
- BALL, S. J.; PITTILO, R. M.; LONG, P. L. Intestinal and extraintestinal life cycles of eimeriid coccidia. *Advances in Parasitology*, v. 28, p. 1-54, 1989.
- BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. P. The coccidian oocysts: a tough nut to crack! *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 416-423, 2006.
- BERTO, B. P; LOPES, C. W. G. Coccidia of Wild Birds as Ecological Biomarkers: Some Approaches on Parasite-Host-Environment Interaction. *The Journal of parasitology*, p. 106, 2020.

- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: RUIZ, L.; IGLESIAS, F. Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease. New York: Nova Science Publishers, p. 47-66, 2013.
- 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*, v. 80, p. 159-204, 2011a.
- BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Two new hosts for *Isoospora tiesangui* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 32, p. 168-171, 2010.
- BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Isoosporoid coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) parasites of tanagers (Passeriformes: Thraupidae) from the Marambaia Island, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, p. 798-805, 2011b.
- BERTO, B. P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. Studies on coccidian oocysts 126 (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, p. 1-15, 2014.
- CENTRO DE ADESTRAMENTO DA ILHA DA MARAMBAIA – CADIM. Disponível em: <<https://www.forte.jor.br/2010/09/22/cadim-centro-de-adestramento-da-ilha-da-marambaia/>>. Acesso em: 03 set. 2022.
- DOLNIK, O. V. Diurnal periodicity of oocysts release of *Isoospora dilatata* (Sporozoa: Eimeriidae) from the common Starling (*Sturnus vulgaris*) in nature. *Parazitologiya*, v. 33, p. 74-80, 1999.
- DOLNIK, O. V. Some aspects of the biology and host–parasite interactions of *Isoospora* spp. (Protozoa: Coccidiida) of passerine birds. PhD dissertation, Carl von Ossietzky University, p. 97, 2002.

- DOLNIK, O. V.; DOLNIK, V.R.; BAIRLEIN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, v. 98(1), p. 97-103, 2010.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83, p. 333-336, 1997.
- FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. Parasitismo, Doença Parasitária e Paleoparasitologia. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Editor José Rodrigues Coura. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 2005.
- FREITAS, M.F.L.; OLIVEIRA J.B.; CAVALCANTI M.B.; FREITAS D.A. Occurrence of coccidiosis in canaries (*Serinus canarius*) being kept in private captivity in the state of Pernambuco, Brazil. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 58, p. 86-88, 2003.
- FUJIHARA, M. A; CAVALCANTI, R.; GUIMARÃES, A.; GARLIP, R. O Valor das Florestas. São Paulo: Terra das Artes Editora, 2009.
- GARDINER, C.H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook, v. 651, p. 83, 1988.
- GILL, H.; PAPERNA, I. Proliferative visceral *Isoospora* (atoplasmosis) with morbid impact on the Israel sparrow *Passer domesticus biblicus* Hartert, 1904. *Parasitology Research*, v.103, p. 493-499, 2008.
- GODOY S.N.; MATUSHIMA E.R. A survey of diseases in Passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo city, Brasil. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 24, p. 199-209, 2010.
- GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. I: Compléments à l'étude systématique = *Isoospora* of sparrows. I: Complementary data on the systematics. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, v. 61, p. 155-160, 1986a.
- GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. II: Etudes sur la biologie = *Isoospora* of sparrows. II: Studies on biology. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, v. 61(2), p. 161-192, 1986b.
- GRULET, O.; LANDAU, I.; MILLET P.; BACCAM, D. Les *Isoospora* du moineau. III: Action élective de la primaquine sur les formes d'attente = *Isoospora* of sparrows. III:

- Elective action of primaquine on latent stages. *Annales de Parasitologie humaine et Comparee*, v. 61 (2), p. 193-198, 1986c.
- LEVINE, N. D. *Isospora passeris* n. sp. from the house sparrow *Passer domesticus*, *I. lacazei*, and related apicomplexan protozoa. *Transactions of the American Microscopical Society*, v. 101, p. 66–74, 1982.
- LEVINE, N. D. *Veterinary Protozoology*. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1985.
- LONG P.L. *The biology of the Coccidia*. Edward Arnold, London, UK, ed (2), 1982.
- LOPES, B. B.; BALTHAZAR, L. M. C.; COELHO, C. D.; BERTO, B. P.; NEVES, D. M.; LOPES, C. W. G. Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae). *Coccidia*, v. 1, p. 6-9, 2013b.
- LOPES, B. B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; GALVÃO, G. S., LOPES, C. W. G. The rubycrowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Coccidia*, v. 1, p. 2-5, 2013a.
- LÓPEZ, G; FIGUEROLA, J; SORIGUER, R. Time of day, age and feeding habits influence coccidian oocyst shedding in wild passerines. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 559-564, 2007.
- MAGALHÃES-MATOS P. C.; SILVA, M. B. V.; SOUZA, P. G. S.; LIMA, D. H. S.; MORAIS, R.; FARIAS, D. M; ALVARENGA, L. C. O; I GABRIEL, A. M.; OLIVEIRA, W. B. L.; GÓES-CAVALCANTE, G.; SCOFIELD, A. Occurrence of eggs and oocysts of gastrointestinal parasites in passerine birds kept in captivity in Para State, Brazil /Ocorrência de ovos e oocistos de parasitos gastrointestinais em aves Passeriformes mantidas em cativeiro no estado do Pará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 46, p. 2177-2181, 2016.
- MELLO, E. R.; OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, L. A. S.; CARDOZO, S. V.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; BERTO, B. P. *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*; v. 2, 2022.
- MARTINAUD, G.; BILLAUDELLE, M.; MOREAU, J. Circadian variation in shedding of the oocysts of *Isospora turdi* (Apicomplexa) in blackbirds (*Turdus merula*): an adaptative trait against desiccation and ultraviolet radiation. *International Journal for Parasitology*, v. 39(6), p. 735-739, 2009.
- MARTINS, V.F.; CAZOTTO, L.P.D.; SANTOS, A.M.S. Dispersal spectrum of four forest types along an altitudinal range of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Biota Neotropica*, v. 14(1), 2014.
- McQUISTION, T. E. The prevalence of coccidian parasites in passerine birds from South Africa. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, v. 93 (3) p. 221-227, 2000.
- MISOFF, K. Diurnal cycle of *Isospora* spp. Oocyst shedding in Eurasian blackbirds (*Turdus merula*). *Canadian Journal of Zoology*, v. 82 (5), p. 764-768, 2004.
- MOREIRA-LIMA, L. Aves da Mata Atlântica: riqueza, composição, status, endemismo e conservação. Dissertação (mestre em Ciências) Universidade de São Paulo, 2013.
- OLIVEIRA, P. S.; FERREIRA, A. F.; SILVA, L. M.; RODRIGUES, M. B.; CARDOZO, S. V.; BERTO, B. P. Diversity and distribution of coccidia of wild birds in a Atlantic forest fragment area in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 26 (4), p. 457-464, 2017.
- 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*, v. 29 (2), 2021.
- REY, L. Dicionário de termos técnicos de medicina e Saúde, 2º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 950, 2003.
- REZENDE, C. L.; SCARANO, F.R.; ASSAD, E.D.; JOLY, C.A.; METZGER, J. P.; ESTRASBURGO, B.B.N.; TABARELLI, M.; FONSECA, G.A.; MITTERMEIER,

- R.A. From hotspot to hopespot: an opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 16 (4), p. 208-214, 2018.
- RUGGIERO, M.A; GORDON, D.P.; ORRELL, T.M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R.C. A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS ONE*, v. 10(4), 2015.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p. 862, 1997.
- SIMON, J. E.; PERES J.; RUSCHI P. A. A importância da Serra das Torres para a conservação de aves no estado do espírito santo, sudeste do Brasil. *Revista Científica FAESA*, v. 4 (1), p. 47-62, 2008.
- SOS MATA ATLÂNTICA. INSTITUTO DE PESQUISA DO MCTI. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Relatório técnico. São Paulo. 2022.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L. WALL, R.R. *Parasitologia veterinária*. 4º ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- UPTON, S. J. Suborder Eimeriorina Léger, 1911. In: LEE, J. J.; LEEDALE, G. F.; BRADBURY, P. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2º ed. London: Society of Protozoologists, p. 318-339, 2000.
- WOBESER, G. A. Parasitism: Costs and Effects. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Ames: Wiley-Blackwell, 2008.

CAPÍTULO I

Observações sobre uma espécie de *Eimeria* sp. (apicomplexa) do martim-pescador-pequeno *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Coraciiformes) no sudeste do Brasil: Um exemplo de como os aspectos ecológicos do hospedeiro podem ser essenciais para a identificação de seus coccídios.

1. RESUMO

O parasitismo em martim-pescadores é muito pouco relatado e predominantemente relacionado a hemoparasitas, helmintos e ectoparasitas. O presente estudo proporcionou um estudo morfológico e genotípico de uma espécie de *Eimeria* sp. recuperada de um martim-pescador-pequeno *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) capturado na Ilha da Marambaia, litoral do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. A densidade coccidiana, 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 pseudoparasita.

2. INTRODUÇÃO

Martim-pescadores são aves coraciformes que pertencem à família Alcedinidae, que compreende 120 espécies em todo o mundo (IUCN 2021). Possuem ampla distribuição geográfica, com a maioria das espécies ocorrendo em zonas tropicais e subtropicais, próximas a ambientes aquáticos (SICK, 1997). No Brasil, existem cinco espécies, sendo quatro do gênero *Chloroceryle* Kaup, 1848, mais o martim-pescador-grande *Megaceryle torquata* (Linnaeus, 1766) (PACHECO et al. 2021).

O martim-pescador-pequeno *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) é a ave alcedinídea mais comum no Brasil, vivendo ao longo de rios, lagos, costas, manguezais e foz de rios. Esta espécie se alimenta principalmente de peixes de 3 a 5,5 cm, no entanto, é uma espécie muito generalista e também é observada alimentando-se de pequenos vertebrados e invertebrados (SICK 1997; WIKIAVES 2021).

O parasitismo em *C. americana* é muito pouco relatado e restrito a hemoparasitas, helmintos e ectoparasitas (RODA & FARIAS, 1999; LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2018; CARVALHO et al., 2021), embora haja um relato de *Eimeria* de martim-pescador-pequeno no Município de Rio Branco, no Estado do Acre, no Norte do Brasil (ALMEIDA BRITO et al., 2017). Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo relatar oocistos de uma espécie de *Eimeria sp.* recuperados de amostras fecais de *C. americana* capturadas no manguezal da Ilha da Marambaia, litoral brasileiro, associando este achado a um possível pseudoparasitismo. Além disso, o presente estudo forneceu uma identificação genotípica, além do estudo morfológico para esta *Eimeria sp.*, via sequenciamento do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo *c* oxidase (COI).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Duas expedições em junho de 2019 e novembro de 2021 foram realizadas no manguezal da Ilha da Marambaia (23° 3' 52,90" S, 43° 59' 22,80" W), no litoral do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, onde cinco espécimes de *C. americana* foram capturadas com redes de neblina (dois indivíduos em 2019 e três em 2021) (Figura 1). Os martim-pescadores foram mantidos em caixas individuais e as gotículas fecais foram coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação das espécies, as aves foram fotografadas e soltas e as amostras fecais foram colocadas em tubos de centrífuga contendo solução de dicromato de potássio 2,5% ($K_2Cr_2O_7$) a 1:6 (v/v).

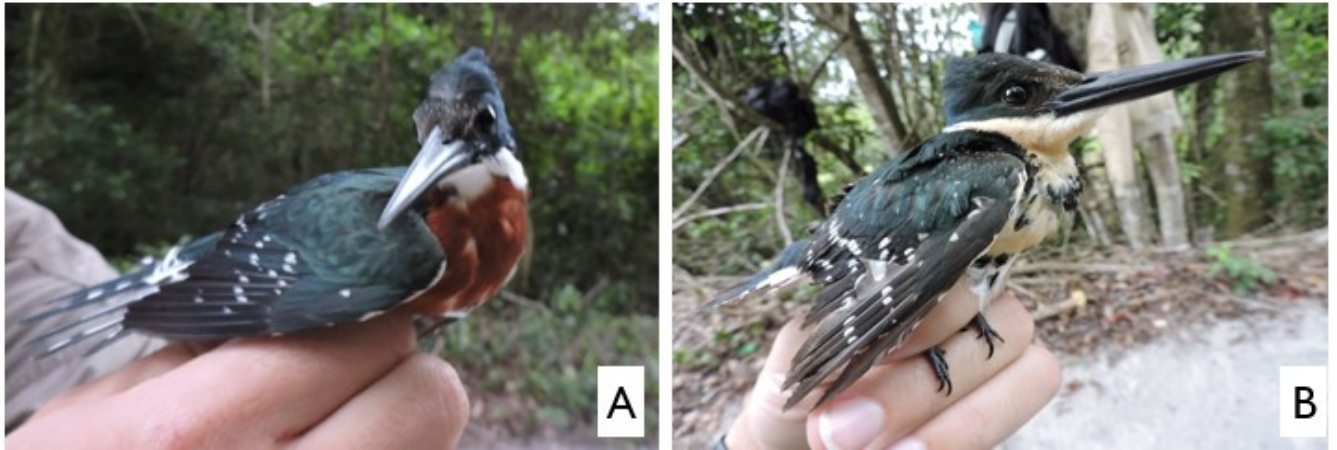


Figura 1. Espécimes de *C. americana*, (A) macho e (B) fêmea, capturados na Ilha da Marambaia, RJ.

3.2. Análise morfológica

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), incubadas a 23–28 °C e oxigenadas regularmente por agitação dos tubos de centrífuga por 7 dias. Os oocistos foram isolados por flutuação em solução 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 feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Os desenhos de linha foram editados usando dois aplicativos de software do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Versão 11.0, Corel Corporation, Canadá), Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT. Todas as medições estão em micrômetros e são dadas como a faixa seguida pela média entre parênteses.

3.3. Análise molecular

Doze oocistos do mesmo morfotipo através de microscópio de luz, que foram recuperados de uma única gota fecal, foram isolados, ressuspensos em PBS e lavados por centrifugação até que o sobrenadante se tornasse claro (DOLNIK et al., 2009).

O DNA foi extraído dos oocistos usando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A fim de lisar completamente os oocistos, quatro ciclos de congelamento-descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA. A amplificação por PCR para o gene COI foi realizada conforme descrito anteriormente por Genovez Oliveira et al., (2020). Os iniciadores: JAVF (5'-CTGAATTTGGTTCAGGTGTTGGT-3') e JAVR (5'-TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG-3') produziram um tamanho de produto de PCR de ~ 651pb. Para amplificação, uma reação de PCR de 25- μ l foi preparada usando 3 μ L de DNA genômico, 0,25 μ L de cada Primer (0,2 μ M) e 9 μ L de Água Livre de Nuclease. A PCR foi conduzida usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s e 72°C por 50s e uma extensão final de 72°C durante 5 min. As amplificações foram purificadas usando o kit Qiagen MinElute PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil). O produto de PCR foi sequenciado usando os primers direto e reverso de PCR pela biotecnologia Ludwig, onde um ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi usado 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 coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST). Árvores filogenéticas foram construídas para espécies de coccídios nas sequências COI alinhadas com isolados adicionais do GenBank. *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908) foi usado como grupo externo. As análises de distância e filogenias foram realizadas usando MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Resumidamente, arquivos de cromatograma de sequenciamento de Sanger foram importados para MEGA X e as sequências de nucleotídeos de cada região gênica foram

curadas, analisadas e alinhadas com sequências de referência do GenBank usando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Árvores de máxima verossimilhança (ML) e de junção de vizinhos (NJ) foram construídas e as distâncias foram calculadas usando o método Tamura-Nei com base na seleção de modelos usando ModelTest no MEGA X.

As análises de bootstrap foram conduzidas usando 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvore inferidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos cinco martim-pescadores capturados, apenas um deles, capturado em junho de 2019, estava eliminando oocistos de coccídios em suas fezes. Mais precisamente, das cinco gotículas fecais coletadas deste indivíduo, apenas duas apresentavam 8 e 12 oocistos. Esses oocistos (Figura 1A–E) são subsféricos, 14,7 (14–15) × 13,8 (13–14), com relação comprimento/largura (L/W) de 1,07 (1,0–1,1). Parede do oocisto em bicamada e lisa, com cerca de 1,0 de espessura.

Micropila e resíduo de oocisto estava ausente, com 1-2 pequenos grânulos polares presentes. Esporocistos irregularmente ovóides, 9,6 (9–10) × 5,6 (5–6) µm, com relação L/W de 1,72 (1,5–1,9). Corpo de Stieda pequeno e achatado, 0,5 de altura x 1,0 de largura. Corpo sub-Stieda arredondado, 1,0 de altura × 1,5 de largura. Corpo para-Stieda ausente. Esporocistos residuais presentes, consistindo de numerosos grânulos que parecem ser delimitados por membranas. Esporozoítos com corpos refráteis anterior e posterior.

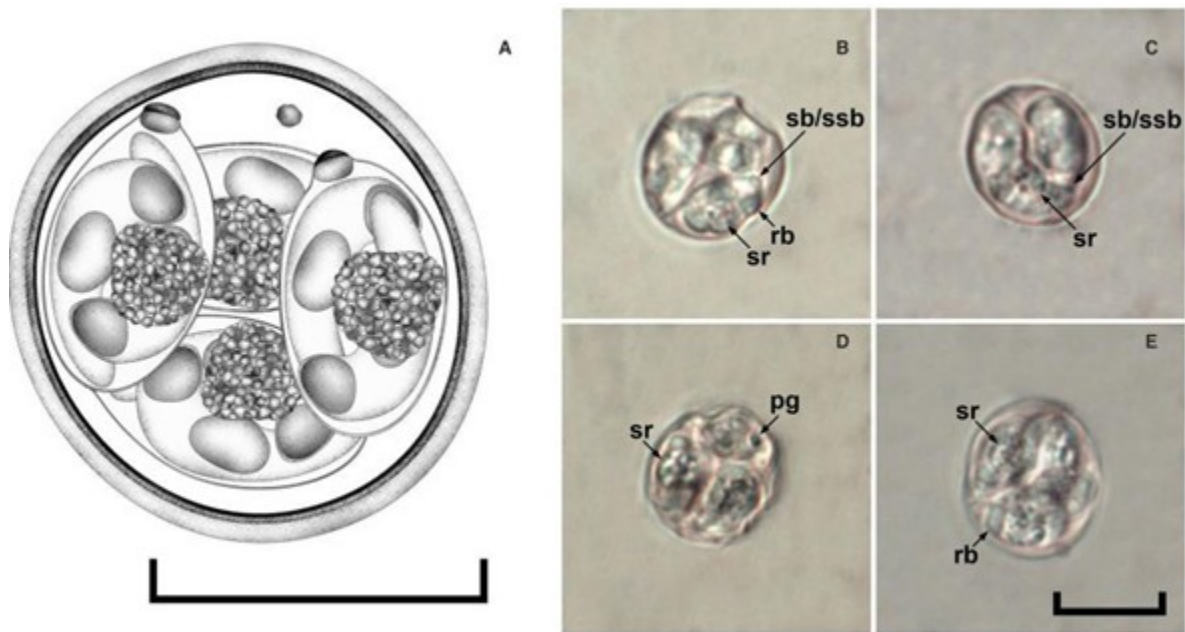


Figura 2. Desenho de linhas (A) e fotomicrografias (B–E) de oocistos esporulados de *Eimeria* sp. recuperado de um martim-pescador-pequeno *Chloroceryle* americana. Observe o grânulo polar (pg); Stieda e corpos sub-Stieda (sb/ssb); resíduo de esporocisto (sr); e corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10 µm.

Fotomicrografias, 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 repositório número 119/2021. Fotomicrografias do espécime de *C. americana* estão depositados na mesma coleção.

Os únicos relatos descritivos de *Eimeria* spp. de aves Alcedinidae foram por Varghese (1977) que descreveu *Eimeria galateai* Varghese, 1977 de *Tanysiptera galatea* Gray, 1859 e *Eimeria duncani* Varghese, 1977 de *Todiramphus sanctus* (VIGORS & HORSFELD, 1827) em Papua Nova Guiné. *Eimeria galateai* é semelhante em tamanho a *Eimeria* sp. deste estudo, porém, diferencia-se por seus oocistos ovóides alongados com saliências nas extremidades. *Eimeria duncani* possui oocistos ovoides truncados na extremidade mais estreita e é maior que os oocistos deste estudo. Em Varghese (1977), os martim-pescadores foram mantidos em gaiolas individuais, livres de coccídios, e alimentados com larvas e insetos adultos, reduzindo o risco de contaminação e/ ou pseudoparasitismo por predação de presas parasitadas. Além

disso, amostras de fezes frescas foram obtidas com centenas de oocistos não esporulados que garantiram a relação parasita-hospedeiro entre martim-pescador e *Eimeria* spp.

Alternativamente, alguns aspectos da descoberta desta *Eimeria* sp. de *C. americana* na Ilha da Marambaia levantam dúvidas se esta é uma verdadeira relação parasitária. Primeiro, o grupo de pesquisa do Prof. Bruno Pereira Berto vem pesquisando coccídios de aves na Ilha da Marambaia desde 2007 (LOPES et al., 2013), onde desde então já foram capturados mais de uma centena de martim-pescadores-pequenos, todos, até o momento, negativos para coccídios. A ilha possui três biomas predominantes: Mata Atlântica, Restinga e Mangue; no entanto, a grande maioria das expedições realizadas pelo grupo de pesquisa na ilha foi realizada em áreas de Mata Atlântica, sendo apenas as expedições de junho de 2019 e novembro de 2021 realizadas no mangue, onde a abundância e diversidade de presas para *C. americana* é bem diferente (SICK, 1997). Nesse contexto, do ponto de vista ecológico, é bastante razoável que esses oocistos sejam, de fato, parasitas de algumas presas de *C. americana* no manguezal da Ilha da Marambaia, principalmente peixes, mas também outros animais que podem ser ingeridos, digeridos e eliminados pelos martim-pescadores-pequenos. Secundariamente, o baixo número de oocistos observado em menos da metade das gotículas fecais coletadas e oocistos com paredes enrugadas (mesmo em pouco tempo em solução saturada) sugere que esses oocistos possivelmente não sejam parasitas desse martim-pescador-pequeno capturado em 2019. Essa hipótese de pseudoparasitismo é semelhante ao abordado por Trefančová et al. (2019) para coccídios de *Isospora* sp. recuperados de roedores que seriam seus pseudoparasitas e verdadeiros parasitas de Passeriformes.

Para tentar confirmar esta hipótese no presente estudo, na expedição no manguezal da Ilha da Marambaia em 2021, seis espécimes de peixes poeciliídeos foram capturados nos córregos de mangue próximos às localidades onde os martim-pescadores-pequenos foram capturados com redes de neblina, porém esses peixes foram negativos para coccídios. Ressalta-se que, se esta hipótese de pseudoparasitismo estiver correta, a identificação do verdadeiro hospedeiro desta *Eimeria* sp. é bastante difícil, pois os hábitos alimentares do martim-pescador-pequeno são bastante generalistas, principalmente no manguezal da Ilha da Marambaia, que oferece uma grande diversidade de peixes, anfíbios, répteis, crustáceos e

outros animais que são presas em potencial (SICK 1997; LUZ et al., 2008; SANTOS 2009; WIKIAVES 2021).

Outra opção para determinar se o martim-pescador-pequeno é o verdadeiro hospedeiro desta *Eimeria* sp. é sacrificar um indivíduo e examinar o trato intestinal histologicamente em busca de estágios endógenos do coccídio; porém, no Brasil, as aves nativas são protegidas por lei e fiscalizadas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). De qualquer forma, a morfologia dos oocistos observados do martim-pescador-pequeno neste estudo é típica de *Eimeria* spp. dos peixes, tanto em relação ao tamanho, pois os coccídios dos peixes tendem a apresentar oocistos pequenos, quanto a morfologia da parede do oocisto, que tende a ser mais delicada e murchar facilmente (MOLNÁR & FERNANDO 1974; DYKOVÁ & LOM1981; MOLNÁR 2000; COUSO-PÉREZ et al. 2019). Esta parede delicada também é típica de *Goussia* spp., que são predominantemente relatadas de peixes (MOLNÁR, 2000); entretanto, os oocistos do presente estudo apresentaram constantes quatro esporocistos por oocisto, com corpos de Stieda e sub-Stieda, características inerentes ao gênero *Eimeria*.

A identificação molecular pelo gene COI (número de acesso GenBank: OL773690) reforça a hipótese de que esta *Eimeria* sp. está distante de *Eimeria* spp. das aves, uma vez 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 esta *Eimeria* sp. de *C. americana* separada de um clado com *Eimeria* spp. de mamíferos e aves (Fig. 2). Supõe-se que *Eimeria* sp. deste estudo não foi molecularmente próximo de *Eimeria* spp. de peixes por não haver depósitos de coccídios de peixes para o gene COI no GenBank. Na verdade, *Eimeria* spp. de peixes depositadas no GenBank foram sequenciadas predominantemente para genes ribossomais (MOLNÁR et al. 2012) e, portanto, no presente estudo, o sequenciamento para regiões gênicas dos genes ribossomais 18S e 28S também foi pretendido, mas as amplificações para esses genes não foram bem sucedidas. De qualquer forma, no estudo com genes ribossomais de Molnár et al. (2012), observou-se que *Eimeria* spp. de peixes estão relacionados com *Eimeria* spp. de mamíferos e aves, semelhante ao observado na filogenia do presente estudo, ou seja, os cladogramas têm topologia

semelhante nestes estudos mesmo utilizando genes diferentes, com os coccídios de peixes agrupando-se próximos aos de *Eimeria* spp. de mamíferos e aves (Figura 3).

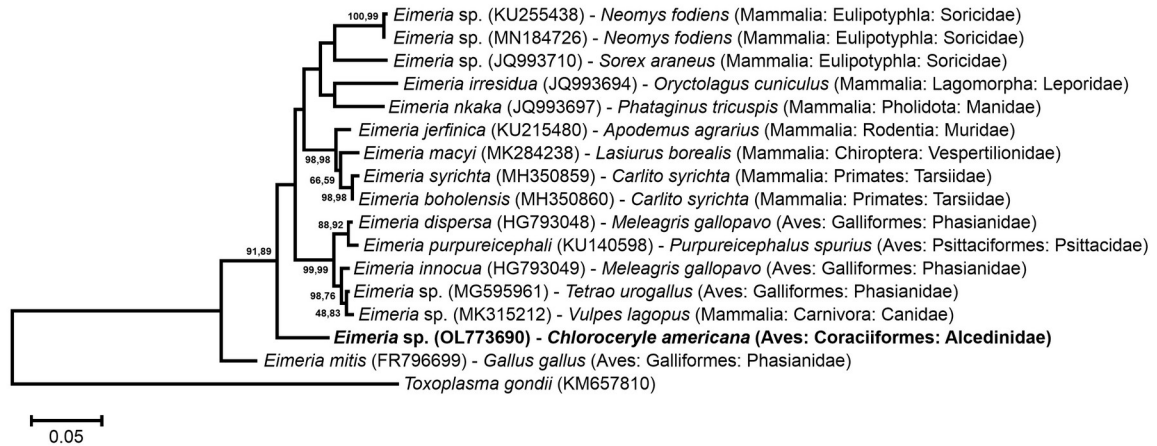


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências COI. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap (1000 réplicas; apenas valores > 50% mostrados) para junção de vizinhos e máxima probabilidade, respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

Em conclusão, o presente estudo identifica fortes evidências ecológicas, morfológicas e moleculares que sugerem um cenário de pseudoparasitismo desta *Eimeria* sp. de *C. americana* no manguezal da Ilha da Marambaia, cujo verdadeiro hospedeiro é um peixe ou outra presa ingerida pelo martim-pescador-pequeno e depois eliminada em suas fezes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-BRITO, A. S.; GUILHERME, E.; ARAÚJO-SANTOS, F.G.; MESQUITA, R.P.; GOMES, F.A. Endoparasites of wild birds from campus area and zoobotanical park, at the federal university of Acre, Rio Branco-Acre. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 20, p. 117–122, 2017.
- BERTO, B. P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G.; Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, p. 1–15, 2014.

- CARVALHO, A. M.; FERREIRA, F. C.; ARAÚJO, A. C.; HIRANO, L. Q. L.; PALUDO, G. R.; BRAGA, É. M. Molecular detection of *Leucocytozoon* in redlegged seriemas (*Cariama cristata*), a non-migratory bird species in the Brazilian Cerrado. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v.31, 2021
- COUSO-PÉREZ, S.; ARES-MAZÁS, E. GÓMEZ-COUSO, H. First molecular data on *Eimeria truttae* from brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research*, v. 118 (7), p. 2121–2127, 2019.
- DYKOVÁ, I. LOM, J. Fish coccidia: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *Journal of Fish Disease*, v. 4, p.487–505, 1981.
- DOLNIK, O. V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, v. 95, p. 169–174, 2009.
- DUSZYNSKI, D. WILBER, P. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83, p.333–336, 1997.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, JL, OLIVEIRA MS, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, 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. *Parasitology International*, v. 75, 2020.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 03 Dez. 2021.
- KUMAR, S.; STECHER, G. L. I. M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547–1549, 2018.
- LOPES, B. B.; BERTO, B. P.; FERREIRA, I.; LUZ, H. R.; LOPES, C, W, G. Coccidial distribution from passerines in an area of Atlantic Forest in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil. *Coccidia*, v.1, p.10–16, 2013.
- LÓPEZ-JIMÉNEZ, A.; DE LEÓN, G. P. P.; GARCÍA-VARELA, M. Molecular data reveal high diversity of *Uvulifer* (Trematoda: Diplostomidae) in Middle America, with the description of a new species. *Journal of Helminthology*, v. 92, p. 725–739, 2018.

- LUZ, H. R.; COSTA, L. M.; PRATA, Á. F.; MORAES, D.; FERREIRA, I.; ESBÉRARD, C. E. L. *Chloroceryle americana* (Gmelin, 1788) (Aves: Coraciiformes) predando lagarto Gymnophthalmidae. *Lundiana* v. 9, p. 77–77, 2008.
- MOLNÁR, K.; FERNANDO, C.H. Some new *Eimeria* (Protozoa, Coccidia) from freshwater fishes in Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, v. 52, p. 413–419, 1974.
- MOLNÁR, K. Two new coccidia, a *Goussia* and an *Eimeria* spp. from the gut of Kessler's goby (*Gobius kessleri* Günther) in the River Danube. *Acta Protozoológica*, v. 39, p. 323–329, 2000.
- MOLNÁR, K.; OSTOROS, G.; DUNAMS-MOREL, D. ROSENTHAL, B. M. *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p.1810–1815, 2012.
- 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*, v. 29 (2), 2021.
- RODA, S. A.; FARIAS, Â. M. I. D. Wild birds infested by Phthiraptera (Insecta) in Pernambuco North Zona da Mata. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, p. 871–878, 1999.
- SANTOS, E. M. Notas sobre predação de anuros em uma poça temporária no nordeste do Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, v. 25, p.77–82, 2009.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p. 862, 1997.
- TREFANCOVÁ, A.; MÁCOVÁ, A.; KVIČEROVÁ, J. Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? *Protist*, v. 170, p. 104–120, 2019.
- VARGHESE, T. *Eimeria galateai* sp. n. from the paradise kingfisher, and *Eimeria duncani* sp. n. from the sacred kingfisher in Papua New Guinea. *The Journal of Protozoology*, v. 24, p. 209–210, 1977.

WIKIAVES. Wiki Aves - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em:
<<https://www.wikiaves.com.br>>. Acesso em: 03 Dez. 2021.

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

CAPÍTULO II

Identificação molecular de *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de cambacicas *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) do Brasil.

1. RESUMO

Isospora coerebae Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 é um coccídio, pertencente ao grupo dos protozoários, descrito a partir dos cambacicas *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758), na Ilha da Marambaia, localizada na costa sudeste do Brasil. Neste trabalho, *I. coerebae* é identificado de *C. flaveola* em uma área protegida próxima à Ilha da Marambaia, mas no continente, estabelecendo uma nova localização de parasitismo, além de fornecer uma caracterização genotípica preliminar via sequenciamento de duas regiões do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (COI). Seus oocistos são subsféricos, $24,4 \times 22,9 \mu\text{m}$, com parede em bicamada e lisa, $\sim 1,7 \mu\text{m}$ de espessura. Micrópila, grânulos polares e resíduo de oocisto estão ausentes. Os esporocistos são ovóides e alongados, $17,6 \times 10,5 \mu\text{m}$. Corpo de Stieda proeminente e arredondado e corpo de sub-Stieda curto e largo. O resíduo de esporocisto é composto por grânulos dispersos de diferentes tamanhos. Os esporozoítos são vermiformes com um corpo refrátil posterior proeminente. Os oocistos do presente trabalho são morfologicamente equivalentes à descrição original de *I. coerebae*, que possuem uma morfologia típica e facilmente identificável, principalmente nos corpos de Stieda e Sub-Stieda. As duas regiões gênicas sequenciadas do gene COI aproximaram *I. coerebae* de *Isospora* spp. do Sudeste do Brasil, mas também de *Isospora* spp. de Passeriformes da América do Norte, Europa e Ásia. Embora haja uma pequena sobreposição entre as duas regiões gênicas sequenciadas no presente trabalho, estima-se que a sequência COI mais longa, que foi recentemente desenhada e ainda não difundida, deve apresentar melhores resultados filogenéticos no futuro.

2. INTRODUÇÃO

Os coccídios são protozoários intracelulares obrigatórios, parasitas do trato intestinal de seus hospedeiros, com distribuição cosmopolita e ciclo biológico composto por merogonia, gametogonia e esporogonia (LEVINE, 1985). Esses protozoários infectam uma ampla gama de hospedeiros, de artrópodes a mamíferos (TENTER et al., 2002; GHEMIRI, 2010). Os coccídios de Eimeriidae são monoxenos, sendo *Eimeria* Schneider, 1875 e *Isospora* Schneider, 1881 os gêneros mais representativos em aves (BERTO et al., 2011; BERTO & LOPES 2013). Em geral, esses microrganismos possuem uma relação parasitária enzoótica, sem grandes danos ao seu hospedeiro ou até mesmo nenhum. No entanto, também é conhecido como agente causador da coccidiose, uma doença parasitária que afeta amplamente os animais de criação, causando perdas econômicas e estando fortemente associada ao estresse ambiental e más condições de manejo (FAYER, 1980; JÚNIOR et al., 2009; CHAPMAN et al., 2013).

A identificação dos coccídios é realizada principalmente através da identificação morfológica dos oocistos, que são a estrutura exógena de resistência ambiental dos coccídios, excretados nas fezes do hospedeiro e infectantes quando esporulados. No entanto, atualmente os estudos moleculares têm sido cada vez mais necessários para fornecer análises filogenéticas moleculares e confirmar e/ou complementar a identificação das espécies (TENTER et al., 2002; OGEDENGBE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2021).

Nesse contexto, *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 é um coccídio descrito por estudos morfológicos e morfométricos de seus oocistos recuperados de amostras fecais de cambacica *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Marambaia, no litoral brasileiro. litoral (BERTO et al., 2010). Consequentemente, neste presente trabalho *I. coerebae* é identificado de *C. flaveola* em uma área protegida próxima à Ilha da Marambaia, mas no continente, estabelecendo uma nova localidade de parasitismo, além de fornecer uma caracterização genotípica preliminar via sequenciamento de duas regiões do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (COI).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Um total de quatro expedições foram realizadas em uma área de proteção ambiental, estabelecida no Brasil como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), denominada Porangaba, no Município de Itaguaí, no Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil (22°48'29,83"S; 43°49'38,77"W). Estas foram realizadas nos meses de julho, agosto, setembro e outubro de 2018. Apenas um indivíduo de *C. flaveola* foi capturado com redes de neblina (Figura 1). O cambacica foi mantido em caixas individuais e as fezes coletadas imediatamente após a defecação. Após a identificação da espécie (SIGRIST, 2014), a ave foi fotografada e solta e as amostras fecais foram colocadas em tubos de centrífuga contendo uma solução de dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) a 1:6 (v/v).



Figura 1. Espécime de *Coereba flaveola* capturado na RPPN Porangaba, Itaguaí – RJ.

3.2. Análises morfológicas

Amostras fecais foram levadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram incubadas em temperatura ambiente (20–25°C). por uma semana. Os oocistos foram recuperados por flotação em solução de

açúcar de Sheather (Gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski & Wilber (1997) e Berto et al. (2014). As observações morfológicas, fotomicrografias e medidas foram feitas com o uso de um microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália) conectada a um computador rodando o software BELView (Versão 6.2.3.0, BEL Engineering, Monza, Itália). Todas as medições estão em micrômetros e são dadas como a faixa seguida pela média entre parênteses.

3.3. Isolamento individual do oocisto e extração de DNA

Um oocisto individual foi isolado de diluições seriadas dos oocistos em gotas em uma lâmina de microscópio usando uma micropipeta estéril. Este oocisto isolado foi colocado em suspensão novamente em PBS e lavado por centrifugação até que o sobrenadante se tornasse claro (DOLNIK et al. 2009). O DNA foi extraído do oocisto usando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Para lisar completamente os oocistos, quatro ciclos de congelamento-descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA (YANG et al. 2014).

3.4. Amplificação de ~250 pb do gene COI (COI1)

A amplificação por PCR de aproximadamente 250 pb do gene COI (COI1) foi realizada por nested PCR, conforme descrito anteriormente por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015). Os primers externos: COIbF1 (5'-GWTCATTAGTATGGGCACATCA-3') e COIbR1 (5'-CCAAGAGA TAATACRAARTGGAA-3'), produziram um tamanho de produto de PCR de ~302pb. Os primers internos: COIbF2 (5'- GGGCA CATCATATGATGAC-3') e COIbR2 (5'- ATAGTATGTATCATGTARWGCAA-3') produziram sequências amplificadas de 257 pb de tamanho. A reação de PCR continha 10µL de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 3µL de 25mM MgCl₂, 1µL de 10mM dNTP's, 0,4µM de cada primer, 1,25 unidades de GoTaq® DNA polimerase, 3µL de DNA (para reação primária) ou 3µL de produto de PCR primário (para reação secundária). Ambas as PCRs primárias e secundárias foram conduzidas usando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de

94°C por 30 segundos, 47°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5min. As amplificações da segunda rodada de PCRs foram purificados usando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

3.5. Amplificação de ~650 pb do gene COI (COI2)

A amplificação por PCR de aproximadamente 650 pb do gene COI (COI2) foi realizada conforme descrito anteriormente por Genovez-Oliveira et al. (2020). Os iniciadores: JAVF (5'-CTGAATTTGGTTCAGGTGTTGGT-3') e JAVR (5'-TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG-3') produziram um tamanho de produto de PCR de ~651pb. 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 9µL de Água Livre de Nuclease. A PCR foi conduzida usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 50 segundos e uma extensão final de 72°C durante 5 min. As amplificações foram purificadas usando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

3.5. Análises de sequências de DNA

Todos os produtos de PCR foram sequenciados usando os primers direto e reverso de PCR da Ludwig Biotechnology, onde um ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi usado para o sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados usando o programa Chromas 2.6. As sequências foram comparadas com outros coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST). Os alinhamentos foram criados em MEGA v10.2.6 usando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). As relações filogenéticas foram reconstruídas usando Inferência Bayesiana no MrBayes v3.2.7 (RONQUIST et al. 2012) e usando o método de máxima verossimilhança no MEGA (KUMAR et al. 2018). A análise de Inferência Bayesiana foi

conduzida sob o modelo evolutivo GTR+G por 1.000.000 gerações, e as árvores foram resumidas após a remoção de 25% do burn-in. Os modelos evolutivos mais adequados para todas as análises filogenéticas foram selecionados pela Seleção de Modelos no MEGA. 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 no MrBayes e MEGA, exportadas no FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) e editadas no Corel PHOTO-PAINT (Corel Draw Graphics Suite, Versão 2020, Corel Corporation, Canadá).

4. RESULTADOS

O indivíduo de *C. flaveola* capturado estava aparentemente saudável e eliminou oocistos de um único morfotipo, que foi morfologicamente identificado da seguinte forma:

***Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2010**

Hospedeiro: Cambacica, *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) Localidade: Reserva Particular do Patrimônio Natural Porangaba (22°48'29.83"S; 43°49'38.77"W), Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.

Amostras: As fotomicrografias estão depositadas e disponíveis na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob o número 115/2021. As fotografias dos espécimes hospedeiros são depositados na mesma coleção (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>).

Sequência de DNA representativa: a amplificação de DNA das regiões gênicas COI1 e COI2 mostrou bandas claras em torno de ~250 bp e ~650 bp, respectivamente. As sequências representativas foram depositadas no banco de dados do GenBank sob os números de acesso: OK194671 (COI1); e OK194672 (COI2).

Local de infecção: Desconhecido.

Prevalência: 100% (1/1).

Esporulação: Exógena. Todos os oocistos foram eliminados nas fezes não esporulados e estavam totalmente esporulados no dia 7 em solução de K₂Cr₂O₇ à temperatura ambiente (20– 25°C).

Morfologia (Fig 1A-F): Oocisto (n = 15) subsférico, 22,4 × 22,9 (24,4 × 22,9); relação comprimento/largura (L/W) 1,0-1,1 (1,07). Parede de duas camadas, parede externa lisa com cerca de 2/3 da espessura total, 1,5-1,8 (1,7). Micrópila, grânulos polares e resíduo de oocisto ausentes. Esporocisto alongado ovoidal, 16-19 × 10-11 (17,6 × 10,5); Razão L/W 1,6-1,8 (1,67). Corpo de Stieda presente, proeminente e arredondado, 1,3-1,5 × 1,9-2,3 (1,4 × 2,1). Corpo de Sub-Stieda presente, curto e largo, 1,0-1,6 × 3,1-3,7 (1,3 × 3,5). Corpo de Para-Stieda ausente. Corpo cristalóide às vezes presente no centro do esporocisto. Resíduo de esporocisto presente, composto por muitos grânulos dispersos de diferentes tamanhos. Esporozóitos vermiformes, com corpo refrátil posterior proeminente.

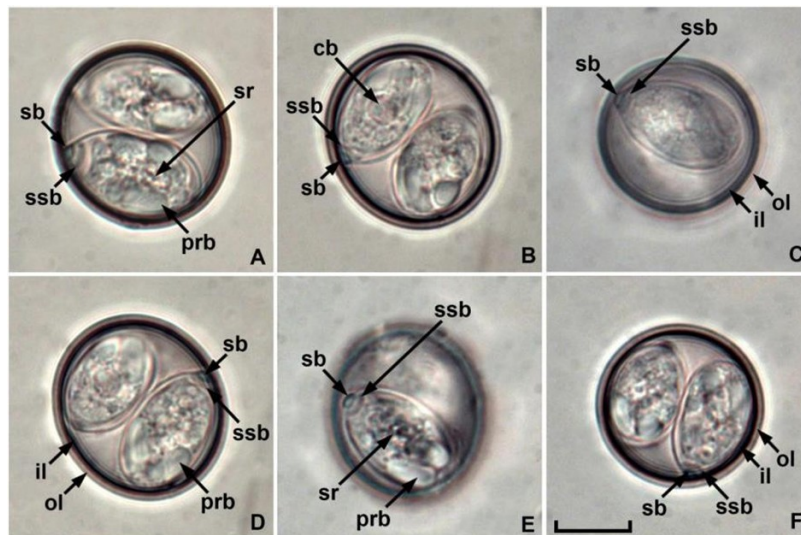


Figura 2. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2010, uma espécie de coccídio recuperada do cambacica *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) do Sudeste do Brasil. Observe o corpo refrátil posterior (prb), corpo cristalóide (cb), camada interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto, resíduo do esporocisto (sr) e os corpos de Stieda (sb) e sub-Stieda (ssb). Barra de escala = 10 µm.

Observações: Os oocistos recuperados de cambacica no presente trabalho são morfologicamente equivalentes à descrição original de *I. coerebae*, que possuem uma morfologia típica e facilmente identificável, principalmente nos corpos de Stieda e Sub-Stieda (BERTO et al. 2010). A Tabela 1 compara a morfologia e morfometria dos oocistos do

presente trabalho com os da descrição original de *I. coerebae*. A morfologia típica dos corpos de Stieda e Sub-Stieda de *I. coerebae* é a base da diferenciação de outra espécie congénica, *Isospora cagasebi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2008, que possui os mesmos tipos de hospedeiro e localidade: *C. flaveola* na Ilha da Marambaia (BERTO et al. 2008) (Tabela 1). No entanto, no presente trabalho não foi observado nenhum oocisto de *I. cagasebi*, que apesar de ser semelhante em algumas características a *I. coerebae*, seus esporocistos possuem corpo de Stieda em forma de botão e corpo de Sub-Stieda proeminente, enquanto *I. coerebae* tem corpo arredondado Corpo de Stieda e corpo de Sub-Stieda curto e largo (BERTO et al. 2010).

Tabela 1. Morfologia comparativa de *Isospora coerebae* registrada em *Coereba flaveola* de diferentes localidades do Sudeste do Brasil.

Coccidia	Hospedeiro	Localidade	Referência	Oocisto							
				Corpo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L Razão	Parede	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar
<i>Isospora coerebae</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Coereba flaveola</i>	Ilha da Marambaia	Berto et al. (2010)	esférico a subsférico	23–27 (24.7)	21–26 (23.3)	1.0–1.1 (1.1)	lisa	ausente	ausente	ausente
		RPPN Porangaba	presente estudo	esférico a subsférico	22–27 (24.4)	22–25 (22.9)	1.0–1.1 (1.07)	lisa	ausente	ausente	ausente
<i>Isospora cagasebi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008	<i>Coereba flaveola</i>	Ilha da Marambaia	Berto et al. (2010)	esférico a subsférico	23–27 (25.2)	23–25 (24.5)	1.0–1.1 (1.1)	lisa	ausente	ausente	ausente
Continuação											
Coccidia	Hospedeiro	Localidade	Referência	Esporocisto							
				Corpo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L Razão	Corpo de Stieda	Corpo de substieda	Resíduo	
<i>Isospora coerebae</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010	<i>Coereba flaveola</i>	Ilha da Marambaia	Berto et al. (2010)	alongado ovoidal	16–19 (17.7)	10–12 (10.9)	1.5–1.8 (1.6)	proeminente e arredondado	curto e largo	grânulos presentes e dispersos	
		RPPN Porangaba	presente estudo	alongado ovoidal	16–19 (17.6)	10–11 (10.5)	1.6–1.8 (1.67)	proeminente e arredondado	curto e largo	grânulos presentes e dispersos	
<i>Isospora cagasebi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008	<i>Coereba flaveola</i>	Ilha da Marambaia	Berto et al. (2010)	alongado ovoidal	17–20 (18.7)	10–12 (11.4)	1.5–1.7 (1.6)	tipo botão	proeminente	grânulos presentes e dispersos	

Análise filogenética: A análise filogenética incluiu sequências de coccídios disponíveis no GenBank (Figs. 2; 3). *Toxoplasma gondii* (NICOLLE E MANCEAUX, 1908) foi usado como grupo externo. Na análise filogenética baseada no gene COI1 (Fig. 2), *I. coerebae* foi recuperado em um clado com a maior similaridade de 99% com *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2008 de tiês-de-topete *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818) do Parque Nacional do Itatiaia, localizado na região serrana do interior do Sudeste do Brasil. Na análise filogenética baseada em COI2 (Fig. 3), *I. coerebae* inseriu-se em um grande clado com *Isospora* spp. de passeriformes da América do Norte, Europa e Ásia, com a maior similaridade de 98% com *Isospora greineri* Hafeez, Stasiak, Delnatte, El-Sherry, Smith e Barta, 2014 de soberbos estorninhos *Lamprotornis superbus* Rüppell, 1845 no Toronto Zoo, Toronto, Canadá.

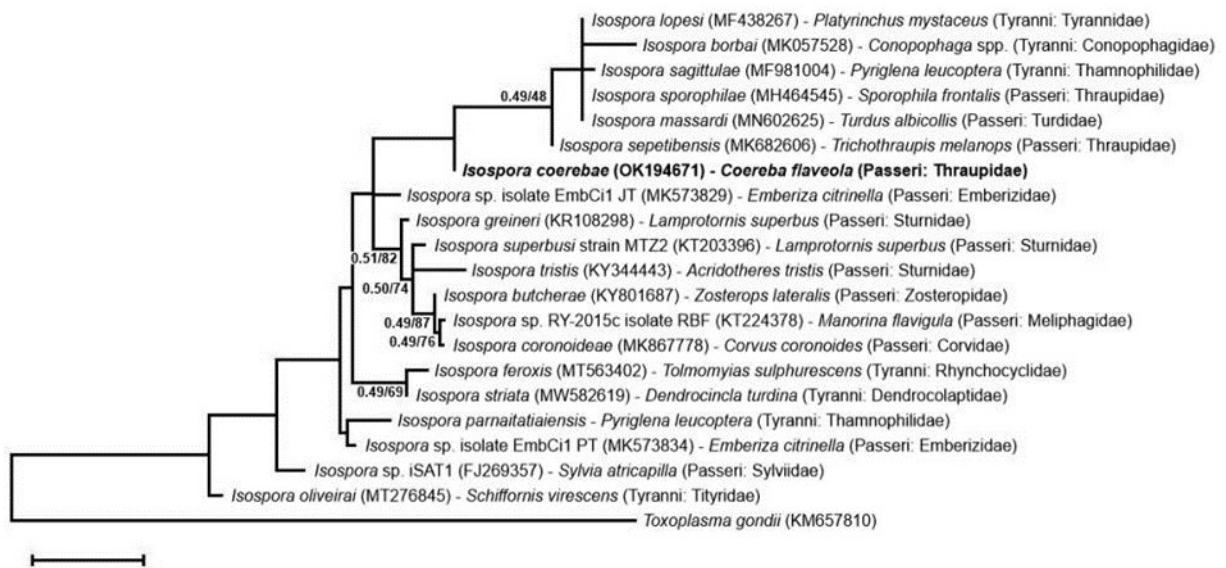


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI1 de espécies de coccídios. Os números nos nós mostram probabilidades posteriores sob a análise de Inferência Bayesiana/valores de bootstrap derivados da análise de Máxima Verossimilhança. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

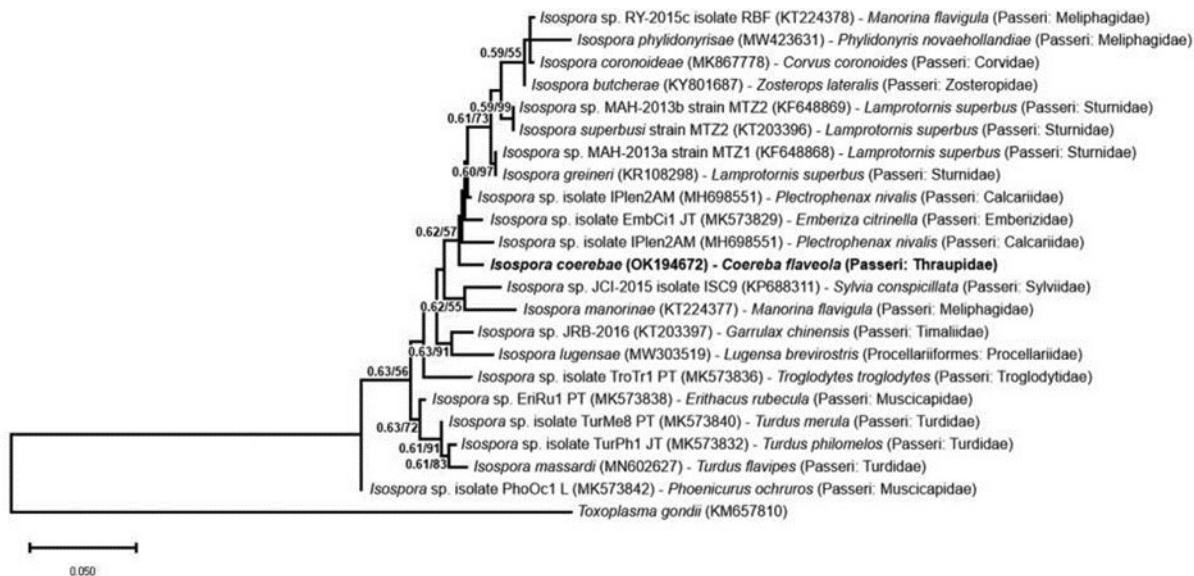


Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI2 de espécies de coccídios. Os números nos nós mostram probabilidades posteriores sob a análise de Inferência Bayesiana/valores de bootstrap derivados da análise de Máxima Verossimilhança. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

4. DISCUSSÃO

A abordagem molecular para o estudo de coccídios ainda apresenta muitas inconsistências, exigindo mais sequenciamento de diferentes genes e regiões gênicas, e em um número maior de espécies. A esmagadora maioria das espécies de coccídios descritas na literatura científica foi baseada no estudo morfológico e morfométrico de oocistos. Isso se justifica pelo fato de as técnicas moleculares serem um advento relativamente recente, enquanto os coccídios eimeriídeos já foram descritos desde o século XIX (DUSZYNSKI & WILBER 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014). Assim, muitos trabalhos recentes mostram uma complementação molecular, e conseqüentemente uma análise filogenética, de espécies já conhecidas pela ciência, como as contribuições de Genovez-Oliveira et al. (2019, 2020); Ortúzar-Ferreira et al. (2021) e Oliveira et al. (2021). Outros trabalhos até promoveram mudanças taxonômicas baseadas em informações genéticas, como o rearranjo taxonômico de *Cryptosporidium* (BARTA & THOMPSON 2006).

Segundo Barta (2001), ferramentas moleculares devem ser úteis, principalmente para inferir relações evolutivas em parasitas protistas, considerando que as características

morfológicas se tornam limitadas em determinados grupos para distinguir espécies, ainda mais para o entendimento da história evolutiva. Irradiações adaptativas e convergências evolutivas são fenômenos que explicam a diversidade dos seres vivos, mas que também podem se tornar confusos ou conflitantes sem uma abordagem genética (WILSON, 1995). Por esta razão, estudos moleculares têm sido amplamente aplicados nas últimas décadas, não como uma técnica substituta, mas para complementar os dados taxonômicos e filogenéticos da espécie. Nesse sentido, vale ressaltar que a morfologia associada aos aspectos biológicos e ecológicos de parasitas e hospedeiros continuam sendo elementares para qualquer estudo taxonômico e/ou filogenético. Os estudos moleculares são, portanto, um complemento excepcional para confirmar ou rejeitar hipóteses, delinear com mais precisão a filogenia de grupos (monofilias, parafilias, etc.), compreender aspectos evolutivos inerentes (polimorfismo e variação genética dentro de uma mesma espécie) e apoiar a descrição de novas espécies (HEWITT ET AL. 1991, GODFRAY & KNAPP 2004, DOLNIK et al., 2009).

Os genes comumente usados no sequenciamento de *Isospora* spp. são os genes ribossômicos e mitocondriais, sendo o 18s um dos mais utilizados. Enquanto os genes ribossômicos são mais conservados, os genes mitocondriais acumulam mais mudanças ao longo do tempo e, portanto, são menos conservados. Nesse sentido, os genes mitocondriais permitem uma melhor abordagem para a separação/identificação de espécies e para delimitar eventos de especiação recentes (SCHRENZEL et al., 2005; DOLNIK et al., 2009; OGEDENGBE et al., 2018). Entre os genes mitocondriais sequenciados para o estudo de *Isospora* spp., o COI tem sido amplamente utilizado, embora trabalhos recentes tenham sequenciado outros genes mitocondriais visando o genoma mitocondrial completo (OGEDENGBE et al. 2016; HAFEEZ et al. 2017; YANG et al., 2017).

No trabalho atual, a amplificação/sequenciamento de uma região gênica do 18S foi tentada, mas não foi bem sucedida; em contraste, duas regiões gênicas do COI foram amplificadas/sequenciadas. A região gênica aqui denominada COI1 é pioneira para *Isospora* spp. de passeriformes (DOLNIK et al., 2019) e tem sido amplamente utilizado nos estudos com identificação molecular de coccídios de passeriformes. No entanto, esta pequena região de ~250 bp (COI1) mostrou-se inadequada para estudos filogenéticos, pois não gerou clados associados à morfologia, biologia e/ou ecologia da espécie (OLIVEIRA et al., 2021). Nesse

sentido, o presente trabalho também utilizou primers que amplificam uma região gênica maior do COI, com ~650 pb (COI2), que foi idealizado por Genovez-Oliveira et al. (2020).

Embora haja uma pequena sobreposição entre as regiões gênicas COI1 e COI2, a sequência mais longa de COI2 deve gerar melhores resultados filogenéticos, embora o número muito pequeno de espécies sequenciadas para essa região gênica não permita maiores conclusões. Portanto, observando a árvore filogenética para a região gênica COI2 (Figura 3), observa-se que *I. coerebae* estava próximo de *Isospora* spp. de passeriformes de fora da região Neotropical, que foram extensamente sequenciados para genes mitocondriais ou tiveram o genoma mitocondrial completo, com apenas *I. massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira e Lopes, 2014 sequenciados de *Turdus* spp. no Brasil para esta mesma região gênica. Por outro lado, na árvore filogenética para COI1 (Figura 2), há uma maior quantidade de sequências de *Isospora* spp. de aves neotropicais, inclusive da mesma família Thraupidae, como tiê-de-topete *Trichothraupis melanops* (Vieillot, 1818), cujo parasito *I. sepetibensis* foi o mais próximo de *I. coerebae* para a região gênica COI1. No entanto, a árvore filogenética para COI1 (Figura 2) ainda é inconclusiva, uma vez que espécies de coccídios com características ecológicas, biológicas e morfológicas próximas estavam distantes e/ou situadas em clados distintos.

A identificação de *I. coerebae* na RPPN de Porangaba reforça a possibilidade de dispersão de coccídios da Ilha da Marambaia para o continente. No trabalho de Rodrigues et al. (2017), um coccídio originalmente descrito de Passeriformes da Ilha da Marambaia também foi identificado em Passeriformes do continente. De fato, a ilha possui uma zona arenosa com cerca de 40 km de extensão (Restinga Costeira da Marambaia) ligada ao continente, o que provavelmente permite a migração de aves do continente para a ilha, favorecendo a dispersão de seus coccídios.

Finalmente, com base nas características morfológicas e moleculares descritas acima, *I. coerebae* é relatada no presente trabalho, documentando uma nova localidade na Mata Atlântica brasileira, a RPPN de Porangaba, sudeste do Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTA, J.R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 175–186, 2001.
- BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C.A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, v. 22 (10), p. 463–468, 2006.
- BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H.R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora coerebae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Passeriformes: Coerebidae) in South America. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20 (1), p. 22- 26, 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 *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, v. 80, p. 159–204, 2011.
- BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. 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, p. 47–66, 2013.
- BERTO, B.P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23 (1), p. 1–15, 2014.
- CHAPMAN, H.D.; BARTA, J.R.; BLAKE, D.; GRUBER, A.; JENKINS, M.; SMITH, N.C.; SUO, X.; TOMLEY, F.M. Uma revisão seletiva dos avanços na pesquisa da coccidiose. *Advances in Parasitology*, p. 93–171, 2013.
- DOLNIK, O.V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, v. 95, p. 169–174, 2009.
- DUSZYNSKI, D.W.; WILBER, P.A. guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83 (2), 1997.

- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, p. 75–103, 1980.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. 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, 2019.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. 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*, v. 75, 2020.
- GHIMIRE, T.R. Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin, 1903. *International Journal of Life Sciences*, v. 4, p. 26–47, 2010.
- GODFRAY, H.C.J.; KNAPP, S. Introduction. *Taxonomy for the twenty-first century*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, v. 359 (1444), p. 559- 569, 2004.
- HAFEEZ, M.A.; BARTA, J.R. The complete mitochondrial genome sequences of two *Isospora* species (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) causing coccidiosis in superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae). *Mitochondrial DNA Part B*, v. 2 (2), p. 895–896, 2017.
- HEWITT, G.M.; JOHNSTON, A.W.B.; JOUNG, J.P.W. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin and New York, p. 410, 1991.
- JÚNIOR, A.B.; SILVA, E.N.; FÁBIO, J.D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. *Doença das aves*. Segunda Edição. FACTA-Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas-SP, p. 1577, 2009.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547–1549, 2018.

- LEVINE, N. D. Veterinary Protozoology. 1^a Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 414, 1985.
- 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 for Parasitology*, v. 41, p. 843–850, 2011.
- OGEDENGBE, M.E.; BRASH, M.; BARTA, J.R. 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*, v. 2 (5), p. 3315–3317, 2016.
- OGEDENGBE, M.E.; EL-SHERRY, S.; OGEDENGBE, J.D.; CHAPMAN, H.D.; BARTA, J.R. Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). *International Journal for Parasitology*, v. 48, p. 59–69, 2018.
- OLIVEIRA, M.S.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.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. *Parasitology Research*, v. 120, p. 2585–2593, 2021.
- 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. Redescription and the molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Systematic Parasitology*, v. 98, p. 333–341, 2021.
- RODRIGUES, M.B.; DE PINHO, I.F.; DA SILVA, L.M.; DO BOMFIM LOPES, B.; LUZ, H.R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G.; BERTO, B.P. 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*, v. 62 (2), p. 306–311, 2017.

- SCHRENZEL, M.D.; MAALOUF, G.A.; GAFFNEY, P.M.; TOKARZ, D.; KEENER, L.L.; MCCLURE, D.; GRIFFEY, S.; MCALOOSE, D.; RIDEOUT, B.A. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *The Journal of Parasitology*, v. 91 (3), p. 635–647, 2005.
- SIGRIST, T. *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. Avis Brasilis, São Paulo, p. 608, 2014.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24 (8), p. 1596–1599, 2007.
- 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.
- WILSON, K.H. Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20 (2), 1992.
- YANG, R.; BRICE, B.; ELLIOT, A.; RYAN, U. *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, v. 159, p. 59–66, 2015.
- 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*, v. 147, p. 16–22, 2014.
- YANG, R.; BRICE, B.; OSKAM, C.; ZHANG, Y.; BRIGG, F.; BERRYMAN, D.; RYAN, U. 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, 2017.

CAPÍTULO III

***Isospora juruviarae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) de juruviaras *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Vireonidae) na América do Sul**

1. RESUMO

Juruviara *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) são passeriformes amplamente distribuídos em todo o Brasil, mas principalmente observados na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do país. Neste contexto, o atual estudo identifica uma nova espécie de *Isospora* Schneider, 1881 de *V. chivi* capturada na Ilha da Marambaia, no Litoral do Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. Os oocistos de *Isospora juruviarae* Andrade & Berto n. sp. são subesféricos a ovais, medindo em média 26 por 24 μm . A micrópila está ausente ou imperceptível. O resíduo do Oocisto está ausente, mas grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são elipsoidais com extremidade posterior pontiaguda, medindo em média 17 por 11 μm . Os corpos de Stieda e Sub-Stieda estão presentes. O resíduo de esporocisto está presente entre os esporozoítos vermiformes, que possuem corpos e núcleos refráteis. Esta morfologia é diferente das outras *Isospora* spp. registradas na mesma família, superfamília e parvorder do hospedeiro. A identificação molecular foi realizada pela amplificação e sequenciamento de dois loci diferentes do citocromo c oxidase mitocondrial, gene da subunidade 1 (cox1) e um locus do gene 18S do RNA ribossômico da subunidade pequena (18S). Análises filogenéticas não foram muito eficientes na formação de grupos monofiléticos associados ao táxon hospedeiro, região zoogeográfica ou caráter taxonômico; no entanto, confirmaram a identificação como uma nova espécie através da comparação com sequências de *Isospora* spp. de passeriformes de vida livre. Finalmente, com base nas análises morfológicas e moleculares de os oocistos recuperados de *V. chivi* no presente trabalho, *I. juruviarae* é considerado novo para a ciência, sendo a segunda espécie registrada na família hospedeira Vireonidae e a primeira a receber suplementação por identificação molecular.

2. INTRODUÇÃO

Os ambientes tropicais apresentam uma grande diversidade de vida, observada em suas mais variadas formas, desde animais e plantas até microorganismos. Apesar desta biodiversidade conhecida, espécies parasitas como os protozoários coccidianos são subestimadas, principalmente em animais silvestres (DUSZYNSKI, 2021). Berto et al. (2021) indicam esse cenário ao relatar que apenas 2% das aves passeriformes do Novo Mundo tiveram sua diversidade examinada quanto ao coccídeos.

A Ilha da Marambaia, localizada na Baía de Sepetiba, litoral do Rio de Janeiro, é um ambiente onde convergem vários tipos de biomas, como manguezais, restinga e Mata Atlântica (BRAZ & AZEVEDO, 2016). Este também é o local de origem de mais de uma dúzia de espécies de coccídeos, descritas em aves de diferentes espécies e famílias (BERTO et al., 2021).

Juruviara *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) é uma espécie de aves pertencente aos passeriformes, amplamente distribuída por todo o Brasil, habitando a camada intermediária de florestas, restingas e florestas urbanas, sendo conhecido pelo seu canto incessante, principalmente na primavera e no verão (SICK, 1997; MELLO et al., 2020). *V. chivi* é derivado da antiga subespécie *Vireo olivaceus chivi* (Vieillot, 1817), que foi recentemente elevada à categoria taxonômica de espécie (PACHECO et al., 2021).

Neste contexto, o presente estudo fornece uma descrição e identificação molecular de uma nova espécie de *Isospora* Schneider, 1881, que foi encontrada em *V. chivi* capturados na Ilha da Marambaia, no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Seis expedições, entre 2019 e 2022, foram realizadas em três áreas com diferentes biomas na Ilha da Marambaia, no litoral do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Duas destas expedições ocorreram numa área de manguezal (23°03'54"S, 43°59'21"W), duas numa

área de Mata Atlântica (23°03'39"S, 43°58'47"W) e duas em Área de Restinga (23°03'47"S, 43°59'18"W). Redes de neblina foram usadas para a captura dos pássaros. Dezesesseis exemplares de *V. chivi* foram capturados em todos os três biomas da Ilha da Marambaia (Figura 1). As aves capturadas foram especificamente identificadas (MELLO et al., 2020; RIDGELY et al., 2015), fotografadas e anilhadas com numeração em anéis de metal fornecidos pela Agência Brasileira de Anilhagem de Aves (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE) (SOUZA & SERAFNI, 2020). Posteriormente, as aves foram alojadas em caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, logo em seguida eram liberadas no mesmo local de captura. Cada amostra fecal das aves era colocada individualmente em um tubo de centrífuga com solução de dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) (DOLNIK, 2006).



Figura 1. Espécime de *V. chivi* capturado na Ilha da Marambaia, RJ.

3.2. Análises morfológicas

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídeos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) por 7 dias. Os cistos de oocistos foram isolados por flotação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1,20) e examinados

microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014). Observações morfológicas, desenhos em linha, fotomicrografias e as 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). Desenhos em linha, fotomicrografias e outras figuras foram editados usando dois softwares aplicativos (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) do Corel DRAW® (Corel Draw Graphics Suite, versão 2020, Corel Corporation, Canadá). Todas as medições estão em micrômetros e são fornecidas como o intervalo, seguido pela média entre parênteses.

3.3. Análises moleculares

Cem oocistos do mesmo morfotipo sob microscopia óptica, que foram recuperados de uma única amostra fecal, foram isolados, ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,9% e lavados por centrifugação até que o sobrenadante ficasse límpido (DOLNIK et al., 2009). O DNA foi extraído dos oocistos usando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante. Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração do DNA para obter a lise completa dos oocistos. A amplificação do PCR de dois loci diferentes (parcialmente sobrepostos) do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (cox1) e um locus do gene 18S de RNA ribossômico de subunidade pequena (18S) foi direcionada (Tabela 1). Para a 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 Master Mix incolor (Promega Labs) (1×), 0,25 µl de cada Primer (0,2 µM) e 9 µl de Água Livre de Nuclease. As amplificações por PCR foram conduzidas usando as condições de ciclagem mostradas na Tabela 1. Os amplicons foram purificados usando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem para amplificação por PCR mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (cox1) e genes 18S de RNA ribossômico de subunidade pequena (18S).

Gene	Locus	Primer	Sequência de Primer	Condições dos ciclos	Referências
<i>cox1</i> (mitocondria)	COIBF1	COIBf1 (external: forward)	5' GWTCATTAGTATGGGCACATCA 3'	35 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 45 s e 72°C por 30 s e uma extensão final de 72°C por 5 min	Dolnik et al., 2009
		COIBr1 (external: reverse)	5' CCAAGAGATAATAACRAARTGGAA 3'		
		COIBf2 (internal: forward)	5' GGGCACATCATATGATGAC 3'		
		COIBr2 (internal: reverse)	5' ATAGTATGTATCATGTARWGCAA 3'		
	JAV	JAVf (forward)	5' CTGAATTTGGTTCAGGTGTTGGT 3'	35 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s e 72 °C por 50 s e uma extensão final de 72 °C por 5 min.	Genovez-Oliveira et al., 2019
		JAVr (reverse)	5' TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG 3'		
18S (nuclear)	INF	INf (forward)	5' CAGGCTTGTCGCCCTGAATA 3'	35 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30 s e 72 °C por 50 s e uma extensão final de 72 °C por 5 min.	Genovez-Oliveira et al., 2019
		INr (reverse)	5' CTGGACCTGGTGAGTTTCCC 3'		

4. RESULTADOS

4.1. Prevalência e descrição

Nove dos dezesseis *V. chivi* capturados na Ilha da Marambaia foram positivos para oocistos de coccídios. Dos dois exemplares capturados na área de floresta tropical atlântica, um deles testou positivo. Na área de mangue, um dos dois *V. chivi* foi positivo. Na área de restinga, seis dos doze *V. chivi* capturados apresentaram resultados positivos para oocistos de coccídios. Os oocistos observados foram classificados no gênero *Isospora*; no entanto, eles não compartilharam os mesmos caracteres taxonômicos com nenhum *Isospora* sp.

previamente registrado em passeriformes do mesmo gênero ou família de hospedeiro (Tabela 2). Este material é descrito a seguir.

Isospora juruviae Andrade & Berto, n. sp. (Fig. 1, 2).

- Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981.
- Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987.
- Infracilo: Apicomplexa Levine, 1970.
- Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901.
- Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879.
- Família: Eimeriidae Minchin, 1903.
- Gênero: *Isospora* Schneider, 1881.

Tabela 2. Morfologia comparativa de *Isospora* spp. registradas na Parvorder Corvida no Novo Mundo.

Espécie de Coccidios	Espécie hospedeira (Superfamília: Família)	Referência	Oocistos							Esporocistos						
			Corpo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Parede (µm)	Micrópila	Granulo polar	Corpo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Corpo de Stieda	Corpo de stieda	sub-Residuo
<i>Isospora brachyrhynchi</i> Wobester & Cawthorn, 1985	<i>Corvus brachyrhynchos</i> Brehm, 1822 (Corvoidea: Corvidae)	Wobester & Cawthorn (1985)	subesférico	15–25 (20.4)	14–23 (18.9)	1.0–1.3 (1.1)	lisa, ~1.0	ausente	presente	alongado	14–20 (16.2)	8–13 (10.6)	1.4–2.0 (1.6)	presente	–	disperso
<i>Isospora cyanocoracis</i> Upton, Current & Clubb, 1985	<i>Cyanocorax chrysops</i> Vieillot, 1818 (Corvoidea: Corvidae)	Upton et al. (1995)	subesférico	25–30 (28.7)	24–29 (26.8)	1.0–1.1 (1.1)	lisa, ~2.0	ausente	presente, 1 a 2	ovoidal	17–21 (19.3)	10–12 (11.4)	1.6–1.8 (1.7)	prominente	homogêneo	agrupado
<i>Isospora calocitta</i> Upton, Langen & Wright, 1995	<i>Cyanocorax formosus</i> (Swainson, 1827) (Corvoidea: Corvidae)	Upton et al. (1995)	subesférico	26–31 (28.8)	25–29 (27.7)	1.0–1.1 (1.0)	levemente enrugado, 1.5–2.0	ausente	presente, 1 a 3	ovoidal	19–22 (20.1)	11–14 (12.6)	1.5–1.7 (1.60)	presente	presente	agrupado
<i>Isospora samoensis</i> Adamczyk, McQuiston & LaPointe, 2004	<i>Foulehaio carunculatus</i> Gmelin, 1788 (Meliphagoidea: Meliphagidae)	Adamczyk et al. (2004)	ovoidal	25–32 (28.9)	23–30 (26.1)	1.0–1.3 (1.1)	lisa	ausente	presente, 1 ou 2	ovoidal	16–18 (17.1)	10–11 (10.9)	1.5–1.7 (1.6)	amplo	retangular	agrupado
<i>Isospora pitiguari</i> Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014	<i>Cyclarhis gujanensis</i> Gmelin, 1789 (Corvoidea: Vireonidae)	Lopes et al. (2014)	subesférico	23–28 (26.8)	23–28 (25.7)	1.0–1.1 (1.0)	lisa, 1.3–1.6 (1.5)	ausente	ausente	arredondado a ligeiramente ovoidal	13–15 (14.4)	10–13 (11.6)	1.2–1.3 (1.2)	achatado	arredondado	disperso
<i>Isospora juruviae</i> n. sp. Andrade & Berto	<i>Vireo chivi</i> (Vieillot, 1817) (Corvoidea: Vireonidae)	Presente estudo	subesférico a ovoidal,	23–29 (26.0)	23–26 (24.3)	1.0–1.2 (1.09)	lisa, 1.0–2.0 (1.4)	discreta	presente, 1 ou 2	elipsoidal com a extremidade posterior pontiaguda	14–19 (16.8)	9–12 (10.6)	1.4–1.9 (1.63)	prominente, tipo-botão	compartimentalizado, trapezoidal	agrupado e/ou disperso

Oocisto (n = 44) subesferoidal a ovoidal, 23–29 × 23–26 (26,0 × 24,3); relação L/W 1,0–1,2 (1,09). Parede em duas camadas, 1,0–2,0 (1,4) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 da espessura total. A micrópila geralmente não é observada, mas parece imperceptível e irregular em alguns oocistos. Resíduo de oocisto ausente, mas 1–2 grânulos polares subesferoidais, elipsoidais ou assimétricos estão presentes.

Esporocisto (n = 44) elipsoidal com extremidade posterior pontiaguda, 14–19 × 9–12 (16,8 × 10,6); relação L/W 1,4–1,9 (1,63). Corpo Stieda presente, proeminente, em forma de botão, 0,8–1,2 de altura × 1,6–1,8 de largura (1,0 × 1,7). Corpo sub-Stieda presente, sutilmente compartimentado e mentalizado (pouco discernível em alguns esporocistos), no qual o centro, compartimento mais denso, de formato subesferoidal a retangular, é diretamente conectado ao corpo Stieda, e o segundo compartimento, menos denso, completa a forma trapezoidal do corpo sub-Stieda, 1,1–1,9 de altura × 2,2–3,0 de largura (1,6 × 2,5). Corpo de Para-Stieda ausente. Resíduo de esporocisto presente, consistindo de numerosos grânulos agrupados e/ou dispersos entre os esporozoítos. Esporozoítos vermiformes, com partes posteriores e corpos refratéis anteriores e um núcleo central.

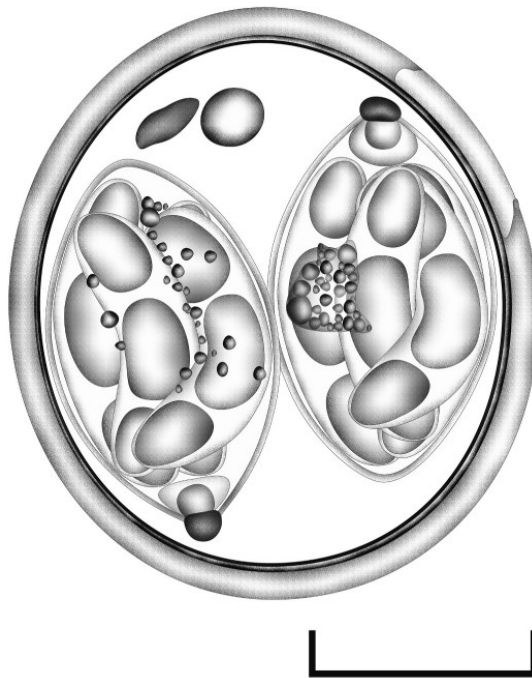


Figura 2 Desenho de linha composta do oocisto esporulado de *Isospora juruviae* de *V. chivi* no Sudeste do Brasil. Barra de escala: 10 μ m.

4.2. Diagnóstico

Isospora juruviarae é a segunda espécie de coccídio registrada em Vireonidae. Os caracteres taxonômicos típicos nos oocistos de *I. juruviarae* são os corpos Stieda e sub-Stieda e o formato do esporocisto. De entre as espécies de coccídios mais intimamente relacionadas com *I. juruviarae*, deve ser mencionada a *Isospora pitiguari* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014, que foi descrita a partir de um hospedeiro da mesma família e localidade tipo (LOPES et al., 2014). *Isospora pitiguari* pode ser facilmente distinguida de *I. juruviarae* pela ausência de grânulos polares, esporocistos arredondados e diferentes formas de corpos Stieda e sub-Stieda.

4.3. Resumo taxonômico

- Hospedeiro tipo: *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) (Aves: Passeriformes: Passeri: Corvida: Corvoidea: Vireonidae), juruviara.
- Localidade tipo: Ilha da Marambaia (23°03'S, 43°59'W), litoral do estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.
- Material-tipo: fotossintipos, desenho em linha e oocistos em 2,5% A solução K₂Cr₂O₇ [16] está depositada e disponível (<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-133/2023. Fotografias do espécime hospedeiro-tipo (simbiótipo) estão depositadas na mesma coleção.
- Sequência de DNA representativa: amplificação de DNA do COIBF1, loci JAV e 1NF (Tabela 1) mostraram bandas claras em torno de ~250 pb, ~650 pb e ~ 444 pb, respectivamente. Sequências representativas foram depositadas na base de dados GenBank sob os números de acesso: OR243295 (COIBF1); OR243296 (JAV); e OR231933 (1NF).
- Registro no ZooBank: para cumprir os regulamentos estabelecidos no Artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Os detalhes da Nomenclatura Zoológica (ICZN 2012) das novas espécies foram submetidos ao ZooBank. O Identificador de Ciências da Vida (LSID) do o artigo é urn:lsid:zoobank.org:pub:71EED286-C9E3-4F61-ACF9-

01C90C6DE6E6. O LSID para o novo nome *Isospora juruviarae* Andrade & Berto n. sp. é urn:lsid:zoobank.org:act:83DA2944-B329-4819-B212-9A253705291D.

- Local de infecção: Desconhecido, oocistos foram recuperados das fezes.
- Prevalência: 56% (9/16) no total; 100% (2/2) em área de Mata Atlântica; 50% (1/2) em área de Mangue; e 50% (6/12) na área da Restinga.
- Etimologia: O nome específico é derivado do nome comum local do hospedeiro, que é 'juruviara'.

3.4. Análises moleculares

Análises moleculares dos oocistos identificados morfológicamente como *I. juruviarae* recuperado de *V. chivi* revelou a presença sequências de *eimeriid* diferentes de outros coccídios depositados na base de dados do GenBank. No locus COIBF1, *I. juruviarae* apresentou as maiores similaridades de 97,3% com sequências depositadas para *Isospora* sp. recuperado da palila *Loxioides bailleui* (Oustalet, 1877), que é um tentilhão criticamente ameaçado de extinção das ilhas havaianas (KUBISKI et al., 2022), e 96,8% com sequências depositadas para *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 de tordos de sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818) e *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 de antvireos simples *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823), ambos do Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil (GENOVEZ-OLIVEIRA et al., 2020; SILVA-CARVALHO et al., 2020).

No locus JAV, *I. juruviarae* apresentou as maiores similaridades de 96,8% com sequências depositadas para *Isospora* spp. recuperadas de palila *L. bailleui* e papagaios-de-nuca preta *Oriolus chinensis* Linnaeus, 1766, que são distribuídos geograficamente entre países do Leste Asiático (KUBISKI et al., 2022), e 96,7% com uma sequência depositada para *Isospora manorinae* Yang, Brice, Jian & Ryan, 2016 da mineradora-de-garganta-amarela *Manorina flavigula* (Gould, 1840) da Austrália (YANG et al., 2016).

No locus 1NF, *I. juruviarae* teve a maior similaridade de 99,0% com sequências depositadas para *Isospora canaria* Box, 1975 (sin. *Isospora serinuse* Yang, Brice, Elliot & Ryan, 2015) das ilhas canárias *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758) (BERTO et al., 2023) e um

Isospora sp. recuperado do americano-robin *Turdus migratorius* Linnaeus, 1766 no Canadá (dados não publicados; Número de acesso do GenBank: MW649140).

3.5. Análises filogenéticas

A análise filogenética baseada nos loci COIBF1, JAV e 1NF incluiu sequências de coccidianos disponíveis no GenBank (Figs. 3-5). *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) foi usada como grupo externo nas filogenias dos loci mitocondriais (Figs. 3, 4), e *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) foi utilizado como grupo externo na análise filogenética do locus 1NF do gene 18S (Fig. 5).

No cladograma referente à análise filogenética do locus COIBF1 (Fig. 3), *I. juruivarae* apareceu em um clado com *Isospora* spp. de passeriformes de diferentes famílias e subordens na região Neotropical, mas também de outras regiões zoogeográficas distantes. No cladograma do locus JAV (Fig. 4), *I. juruivarae* foi agrupado em um grupo monofilético com um *Isospora* sp. de papagaios-de-nuca preta do Leste Asiático (KUBISKI et al., 2022), dentro de um clado maior com *Isospora* spp. de diferentes regiões zoogeográficas do mundo. Os únicos dois *Isospora* spp. da região Neotropical desta análise filogenética, *I. massardi* e *Isospora coerebae* Berto Flausino Luz Ferreira & Lopes 2010, foram agrupados em clados separados (GENOVEZ-OLIVEIRA et al., 2020; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2022). Finalmente, na análise filogenética do locus 1NF (Fig. 5), *I. juruivarae* foi agrupado em um grande clado com *Isospora* spp. de Passeriformes e, mais distante, com *Eimeria* spp. de Galiformes e Psittaciformes. Essas relações foram razoavelmente apoiadas em todas as análises.

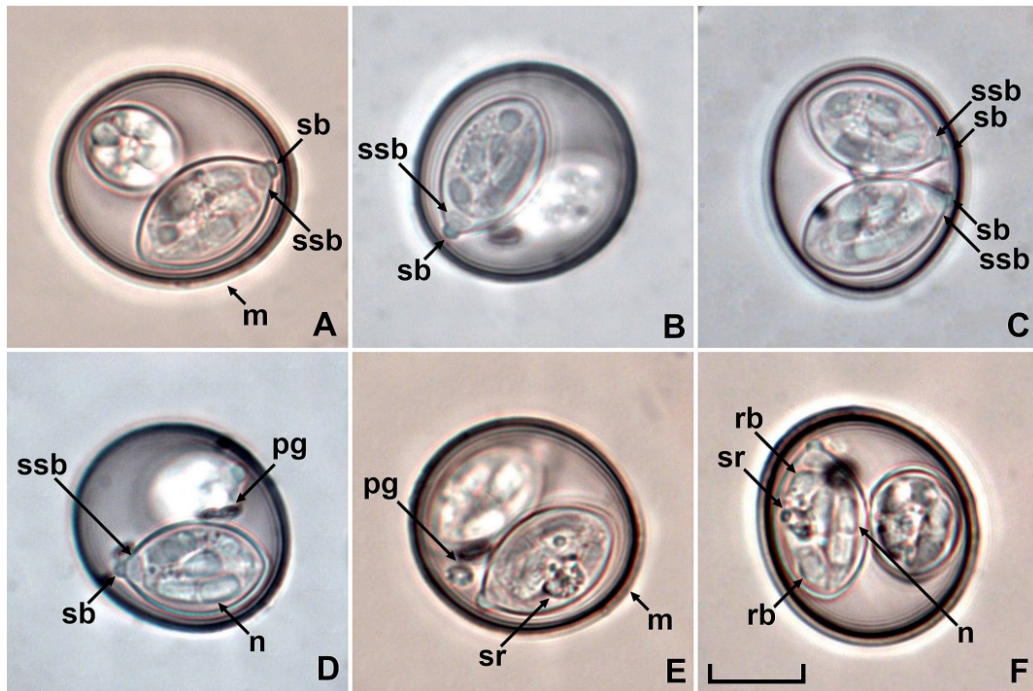


Figura 3. Fotomicrografias de *Isospora juruviae* recuperadas de *V. chivi* no Sudeste do Brasil. Observe a micrópila (m), núcleo (n), grânulos polares (pg), corpo refrátil (rb), resíduo de esporocisto (sr), corpo Stieda (sb) e corpos sub-stieda (ssb). Barra de escala: 10 μ m.

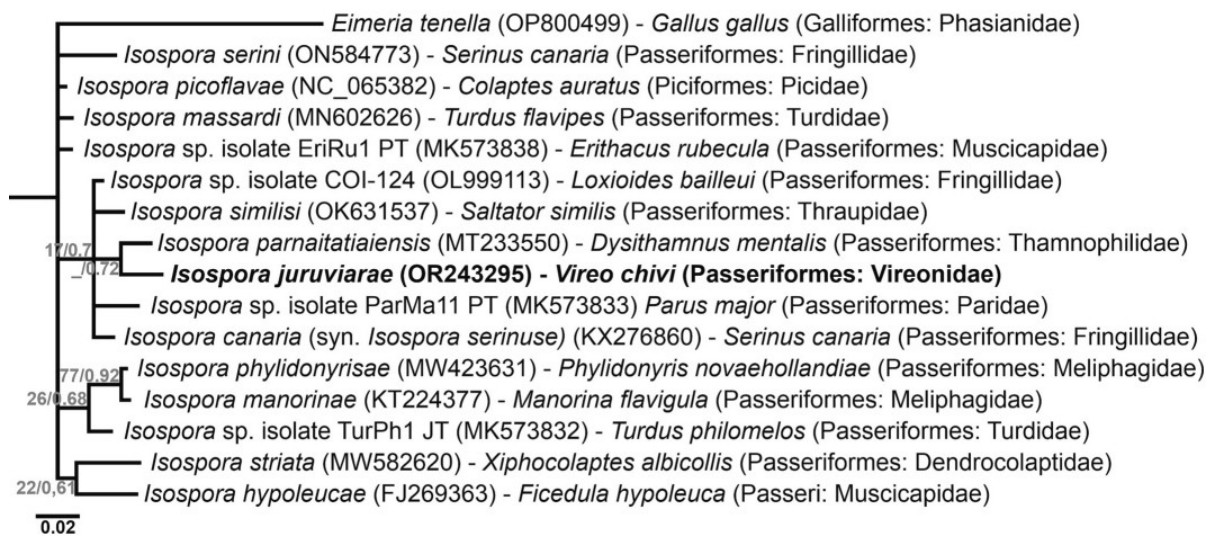


Figura 4. Relação filogenética de *Isospora juruviae* de *V. chivi* inferida por análise Bayesiana para um locus (COIBF1) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós mostram valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a inferência de análise bayesiana. Somente suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, *V. chivi* capturados nos diferentes biomas de Manguezal, Restinga e Mata Atlântica na Ilha da Marambaia foram positivos para *I. juruivarae* com diferentes prevalências, no entanto, não é possível fazer inferências ecológicas devido ao baixo número de *V. chivi* capturados, principalmente nas áreas de Mata Atlântica e Manguezal. Por outro lado, está claro que esses biomas não representam barreiras ecológicas à distribuição e/ou dispersão de *I. juruivarae* na Ilha da Marambaia. Nesse sentido, ao observar a ampla distribuição geográfica de *V. chivi* por toda a América do Sul, somada a outras *Vireo* spp., que também estão distribuídas na América Central e do Norte, pode-se levantar a hipótese de que *I. juruivarae* tem potencial para se dispersar e ser distribuída por todo o Novo Mundo, onde *Vireo* spp. estão distribuídos geograficamente (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2023; BERTO & LOPES, 2020). Além disso, as espécies congênicas de juruviara-boreal *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766), vireo-de-olhos-brancos *Vireo-griseus* (Boddaert, 1783), vireo-de-bigode-preto *Vireo altiloquus* (Vieillot, 1808), vireo-de-garganta-amarela *Vireo flavifrons* Vieillot, 1808 e philadelphia-vireo *Vireo philadelphicus* (Cassin, 1851), que são espécies errantes na Ásia, Europa, África e Oceania, teriam possibilidade de distribuição/dispersão mundial de *Isospora* spp., mesmo que em uma probabilidade muito baixa. Também vale a pena mencionar que, considerando a especificidade de *Isospora* spp. no nível da família hospedeira, há os erpornis-de-barriga-branca *Erpornis zantholeuca* (Blyth, 1844) e picanços-tagarelas *Pteruthius* spp., que são da família Vireonidae e são nativos e distribuídos na Ásia (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2023; BERTO & LOPES, 2020).

O único *Isospora* sp. registrado na família hospedeira Vireonidae é *I. pitiguari* (Tabela 1), que possui a mesma localidade tipo que *I. juruivarae* (LOPES et al., 2014). Nesse sentido, *I. juruivarae* deve ser avaliada como próxima de *I. pitiguari* pelo menos ecologicamente, mesmo que os seus hospedeiros não sejam congêneros. No entanto, os oocistos de *I. juruivarae* são morfológicamente distintos de *I. pitiguari*, em vários caracteres taxonômicos (Tabela 2), apoiando a identificação como uma nova espécie. Além disso, visando ampliar o estudo da comparação morfológica de *I. juruivarae* com outras espécies de coccídeos, além de *I. pitiguari*, *Isospora* spp. registrados em famílias hospedeiras filogeneticamente próximas aos

Vireonidae foram comparadas morfológicamente para comprovar a nova espécie (Tabela 2). Nesse sentido, *Isospora* spp. de outras famílias (Corvidae e Meliphagidae) e superfamílias (Corvoidea e Meliphagoidea) dentro da Parvorder Corvida foram adicionados para fins de comparação morfológica na Tabela 2 (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2023; BRANDS, 2023).

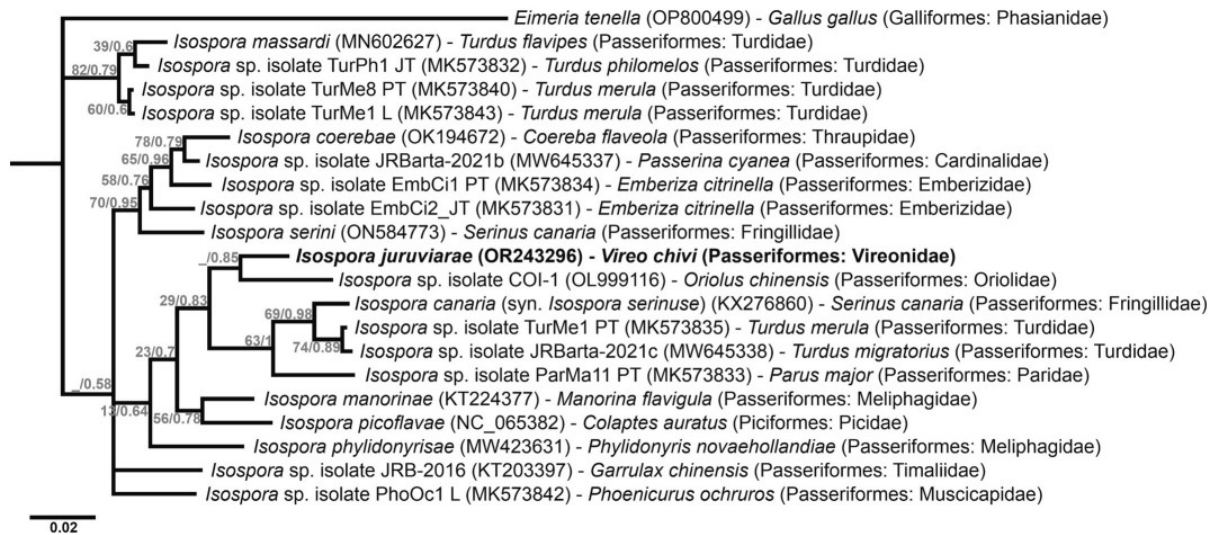


Figura 5. Relação filogenética de *Isospora juruviae* de *V. chivi* inferida pela análise Bayesiana para um locus (JAV) dentro do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Os números nos nós mostram valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Apenas suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.

Os estudos moleculares dos loci sequenciados no presente trabalho não foram conclusivos nas análises filogenéticas (Figs. 3-5) porque não formam grupos monofiléticos com *Isospora* spp. relacionados a algum táxon hospedeiro, região zoogeográfica ou caráter taxonômico. Esses resultados seriam esperados em uma compreensão da coevolução entre coccídios e seus hospedeiros em suas respectivas regiões zoogeográficas (BERTO & LOPES, 2020). Possivelmente o ainda baixo número de depósitos de *Isospora* spp. no Genbank, associado a diferentes loci mitocondriais e nucleares sequenciados para cada coccídio, estão dificultando análises filogenéticas mais conclusivas. Somente na análise do locus 1NF dos neges nucleares 18S, que contém gêneros coccídios, um agrupamento razoável em grupos monofiléticos associados aos táxons hospedeiros foi observado (Fig. 5). A razão para incluir

espécies de táxons superiores, incluindo o grupo externo mais distante, na análise filogenética do locus 1NF, reside no fato de que o gene 18S é conhecido por ser mais conservado do que os genes mitocondriais (GENOVEZ-OLIVEIRA et al., 2020; BERTO et al., 2023; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2022), como pode ser visto pela alta similaridade de ~99% com *Isoospora* spp. e *Eimeria* spp., que são biológica e morfológicamente bastante diferentes. Nesse sentido, esses resultados reforçam que o sequenciamento dos loci de 18S é mais adequado para análises filogenéticas de táxons mais elevados e menos adequado para delimitação de espécies.

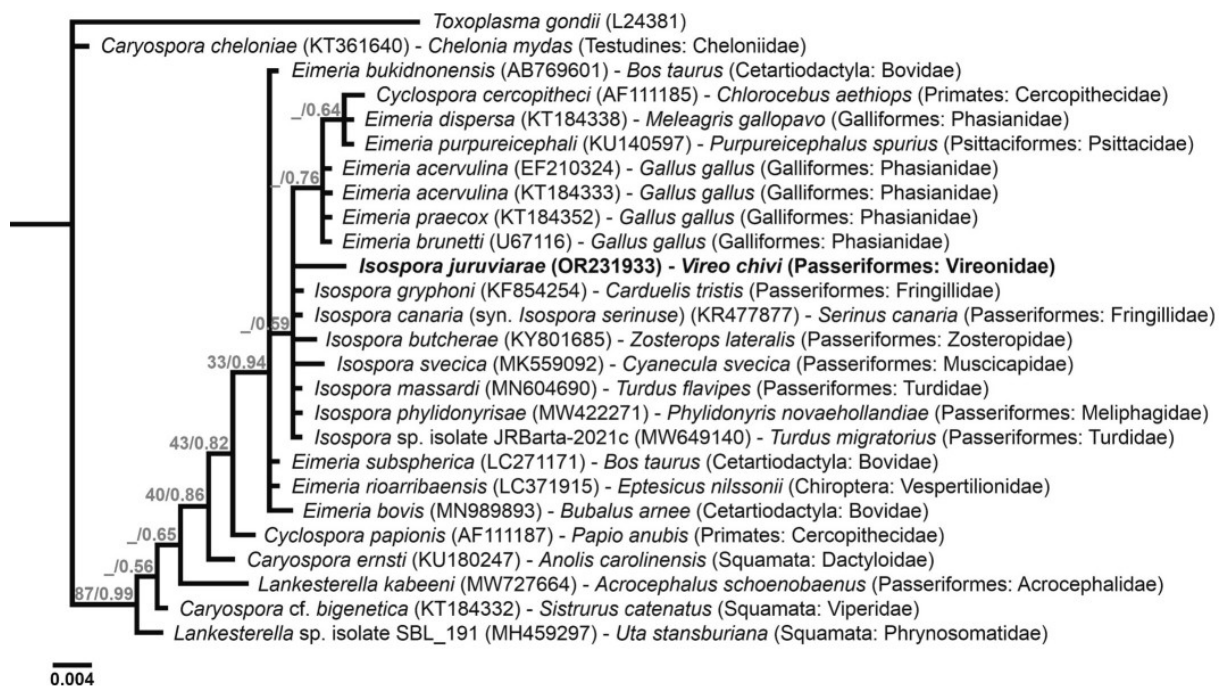


Figura 6. Relação filogenética de *Isoospora juruviae* de *V. chivi* inferida pela análise Bayesiana para um locus (1NF) dentro do gene 18S do nuclear genoma. Os números nos nós mostram valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança/probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana. Apenas suportes de bootstrap e probabilidades posteriores superiores a 50% ou 0,50, respectivamente, são exibidos.

Apesar da eficácia insuficiente da análise filogenética de *Isoospora* spp. de passeriformes, é importante ressaltar que as sequências têm sido altamente eficazes na delimitação e identificação de espécies de coccídios, principalmente nos loci mitocondriais. O recente estudo de Berto et al. (2023) pode ser destacado neste sentido, onde identificaram molecularmente *I. canaria* e *Isoospora serini* (Aragão, 1933) Box, 1975 a partir de sequências

anteriormente relatadas como ‘*Isospora extraintestinal*’ e identificações específicas incorretas, que se tornaram sinônimos juniores. Ao mesmo tempo, Hafeez et al. (2014) diferenciaram dois *Isospora* spp. morfologicamente equivalentes por uma divergência genética de 1,7% no gene *cox1* e 0,6% no gene 18S. Outros eimerídeos, *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909, e *Eimeria necatrix* Johnson, 1930, podem ser destacados, pois são 99,2% idênticos em todo o genoma mitocondrial (ZHOU et al., 2023), embora sejam morfologicamente e biologicamente distintos. Assim, as diferenças nas substituições de nucleotídeos, superiores a 3% para os loci mitocondriais e 1% para o locus do gene 18S, comprovam a identificação de *I. juruviarae* como uma nova espécie em abordagem molecular, pelo menos em comparação com as espécies de coccídios depositadas no GenBank.

5. CONCLUSÃO

Finalmente, com base nos dados morfológicos e moleculares obtidos dos oocistos isosporanos recuperados de *V. chivi* de três diferentes biomas da Ilha da Marambaia, que foram comparados com o *Isospora* spp. e registrado no mesmo Parvorder (Corvida) que o hospedeiro, *I. juruviarae* é considerado novo para a Ciência, sendo a segunda espécie registrado na família hospedeira Vireonidae e o primeiro a ter suplementação por identificação molecular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZYK, K.J.; MCQUISTION, T.E.; LAPOINTE, D. A new coccidian parasite, *Isospora samoensis*, from the wattled honeyeater (*Foulehaio carunculata*) from American Samoa. *Acta Protozoologica*, v. 43, 2004.
- 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*, v. 80, p. 159–204, 2011.

- BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, v. 106, p. 707–713, 2020.
- BERTO, B.P.; MACHADO, E.L.; HOSSOTANI, C.M.S.; BERETTA, B.M.S.; DA-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*, v. 100, p. 245–259, 2023.
- BERTO, B.P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23 (1), p. 1–15, 2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- BRANDS, S.J. *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl>> Acesso em: 27 jun. 2023.
- BRAZ, D.M.; AZEVEDO, I.H.F. Acanthaceae da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Brazil. *Hoehnea*, v. 43 (3), p. 497–516, 2016.
- DOLNIK, O.V. 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*, v. 100, p. 155–160, 2006.
- DOLNIK, O.V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, v. 95, p. 169–174, 2009.
- 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 parasitológica*, v. 68, 2021.

- DUSZYNSKI, D.W.; WILBER, P.A. guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83 (2), 1997.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. 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*, v. 75, 2020.
- HAFEEZ, M.A.; STASIAK, 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, *Lamprotornis superbus* (Aves: Sturnidae). *Parasitology Research*, v. 113, p. 3287–3297, 2014.
- 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 ScienceSci*, v. 9, p. 847030, 2022.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547–1549, 2018.
- LOPES, B.B.; BERTO, B.P.; LUZ, H.R.; GALVÃO, G.D.S.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora pitiguari* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae) *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789. *Zootaxa*, v. 3760, p. 96–100, 2014.
- MELLO, D.J.M.; MELLO, G.J.M.; MALLET-RODRIGUES, F.; LIMA, L.M. *Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação*. Ed. Irmãos Mello, Rio de Janeiro, 2020.
- ORTZAR-FERREIRA, C.N.; ANDRADE, L.A.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, G.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*, v. 5168, p. 83–91, 2022.

- 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*, v. 29 (2), 2021.
- RIDGELY, R.S.; GWYNNE, J.A.; TUDOR, G.; ARGEL, M. *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*. Ed. 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 Biology*, v. 61, p.539–542, 2012.
- Samoa. *Acta Protozoologica*, v. 43, p. 179–181, 2004.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.
- SILVA-CARVALHO, L.M.; PASTURA, D.G.N.; RODRIGUES, M.B.; GOMES, J.V.; OLIVEIRA, M.S.; SIQUEIRA, P.B.; OLIVEIRA, J.L.G.; SOARES, S.S.; OLIVEIRA, Á.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I; BERTO, B.P. Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, v. 97, p. 847–855, 2020.
- SOUSA, A.E.B.A.; SERAFINI, P.P. *Manual de Anilhamento de Aves Silvestres*. Brasília: ICMBio, Cemave, 2020.
- UPTON, S.J.; CURRENT, W.; CLUBB, S. Two new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from passeriform birds of South America. *Systematic Parasitology*, v. 7, p. 227–229, 1995.
- UPTON, S.J.; LANGEN, T.A.; WRIGHT, T.F. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-throated magpie jay *Calocitta formosa* (Passeriformes: Corvidae) from Costa Rica. *Systematic Parasitology*, v. 31, p. 195–199, 1995.

- WILLIAMS, R. B.; THEBO, P.; MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J. Á. Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, v. 76, p. 69–76, 2010.
- WOBESTER, G.A. CAWTHORN, R.J. Exogenous and endogenous stages of *Isoospora brachyrhynchi* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the American crow *Corvus brachyrhynchos* Brehm. *Canadian Journal of Zoology*, v. 63, p. 2639–2645, 1985.
- YANG, R.; BRICE, B.; JIAN, F.; RYAN, U. Morphological and molecular characterization of *Isoospora manorinae* n. sp. in a yellow-throated miner (*Manorina flavigula wayensis*) (Gould, 1840). *Experimental Parasitology*, v. 163, p. 16–23, 2016.
- ZHOU, X.; WANG, L.; ZHU, P.; YANG, Z.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GU, X.; HE, R.; XU, J.; JING, B.; YANG, G.; CHEN, S.; WU, S.; XIE, Y. Comprehensive molecular characterization of complete mitogenome assemblies of 33 *Eimeria* isolates infecting domestic chickens. *Parasites & Vectors*, v. 16, p. 109, 2023.

CAPÍTULO IV

Identificação, densidade e distribuição de coccídios de aves silvestres capturadas dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia no período de 2019 até 2023

1. RESUMO

As aves são hospedeiras de diferentes grupos de endoparasitas e ectoparasitas. Nesse contexto, a ordem Passeriformes é parasitada majoritariamente por coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria*, pertencentes à família Eimeriidae, são os gêneros mais relevantes encontrados nos estudos de aves. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo identificar e quantificar coccídios parasitas de aves silvestres de diferentes espécies, famílias e localidades dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia, RJ. A ordem Passeriformes foi a mais representativa, com 15 famílias ao total, 46 espécies e 229 espécimes contabilizadas. Identificou-se a presença de coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* nas amostras coletadas, com prevalência geral de oocistos de 26,6% (73/274). Notavelmente, apenas 9 famílias foram positivas para infecções por coccídio, foram elas: Columbidae, Icteridae, Passeridae, Thraupidae, Troglodytidae, Turdidae, Tyrannidae, Vireonidae e Alcedinidae (*Eimeria* sp. pseudoparasita). A constatação de maior prevalência de eliminação de oocistos no período da tarde está de acordo com os dados observados em outros trabalhos. Apesar da pequena urbanização e antropização da Ilha da Marambaia pelo Corpo de Fuzileiros Navais da Marinha do Brasil, além da população nativa da ilha, as aves parecem manter uma relação parasita-hospedeiro estável que não alteram suas condições de saúde.

2. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica e o Cerrado estão entre os principais biomas brasileiros, sendo relacionados na lista dos 36 globais (áreas mais importantes para preservar a biodiversidade do planeta) (REZENDE et al., 2018). A Mata Atlântica é um dos biomas prioritários do mundo para ser restaurado, aproximadamente 70% da população brasileira dependem dos

serviços ecossistêmicos desse bioma, porém, ele encontra-se em alto grau de ameaça e risco (SOS MA/IMPE, 2022).

Com relação as aves existentes na Mata Atlântica, esse grupo também possui elevada riqueza de táxons e endemismos, 891 espécies apresentam ocorrência regular no bioma, um dos maiores grupos de vertebrados presentes neste bioma, sendo que grande parte destas aves vivem em ambientes florestais (MOREIRA-LIMA, 2013).

Nestas áreas remanescentes de Mata Atlântica, destacam-se alguns fragmentos de áreas, os quais mantêm conservados os habitats e nicho ecológicos das espécies. A Ilha da Marambaia está situada no litoral da Costa Verde, ao sul do Estado do Rio de Janeiro, próximo à Mangaratiba e Itaguaí, na entrada da Baía de Sepetiba.

Neste contexto, surge a importância do conhecimento da ecologia das aves silvestres, as quais têm extrema importância na conservação da Ilha da Marambaia (BERTO & LOPES, 2013).

Assim como outros animais silvestres, as aves são hospedeiras de diferentes grupos de endoparasitas e ectoparasitas, podendo inclusive serem parasitadas por mais de uma espécie de helmintos e coccídios. Em condições de normalidade imunológica, o hospedeiro mantém um nível de densidade parasitária aceitável, não comprometendo assim a sua saúde. Os coccídios tendem a parasitar aves de vida livre sem causar doença, obtendo equilíbrio entre as reinfecções e níveis saudáveis de imunidade nas aves (MAGALHÃES-MATOS et al., 2016).

O estudo da distribuição e densidade dos ectoparasitas e enteroparasitas das aves silvestres capturadas em diferentes localidades e períodos na Ilha da Marambaia pode evidenciar padrões de prevalências e densidades específicas associadas com determinados aspectos dos hospedeiros e ambientes.

Assim sendo, o presente estudo tem por objetivo identificar (de forma morfológica e molecular) e quantificar coccídios parasitas de aves silvestres de diferentes espécies, famílias e localidades dentro e nas adjacências da Ilha da Marambaia, RJ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A localidade selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi a Ilha da Marambaia. A Ilha da Marambaia está situada no litoral da Costa Verde, ao sul do Estado do Rio de Janeiro, próximo à Mangaratiba e Itaguaí, na entrada da Baía de Sepetiba. A entrada na Ilha da Marambaia é controlada pelo Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais, o qual possui, dentre as outras muitas funções, a proteção ecológica da ilha e o fornecimento recursos e instalações para pesquisa científica (CADIM, 2019).

As expedições para captura de aves e coleta de amostras fecais foram realizadas em três localidades distintas da Ilha (Figura 1). Esses locais foram escolhidos a fim de representar as diferentes fitofisionomias encontradas no bioma Mata Atlântica. Um ponto de captura/coleta foi selecionado em área de manguezal (23°03'54"S, 43°59'21"W), outro em área de Mata Atlântica (23°03'39"S, 43°58'47"W) e outro em área de Restinga (23°03'47"S, 43°59'18"W). Vale ressaltar que esses pontos de coleta estavam em regiões próximas as instalações do CADIM, em locais de livre acesso de civis.



Figura 1. Mapa com os pontos de coleta em diferentes fitofisionomias da Ilha da Marambaia, RJ. Fonte: Google Earth.

As expedições ocorreram entre junho de 2019 e maio de 2023. Cada expedição durou quatro dias ao todo, sendo que dois dias eram utilizados para o deslocamento até a Ilha da Marambaia, tanto ida, quanto na volta. Nos outros dois dias, eram realizadas as capturas das aves e coleta de suas amostras fecais. Foram realizadas oito expedições, com dez horas de redes abertas por dia, totalizando 180 horas de redes abertas.

Nos locais de capturas, foram utilizadas redes de neblina com tamanho total de 9m por 3m, 15m por 3m e 18m por 3m, dimensões de malha de 20mm e 40mm e fixadas em hastes de alumínio do tipo telescópica, objetivando a captura de aves de diversos portes (Figura 2). A frequência de verificação das redes de neblina foi de, aproximadamente 20 minutos, conduzindo-se em sequência com a retirada manual da ave, minimizando o estresse (NASCIMENTO et al., 1994). Em seguida, as aves foram identificadas de acordo com os guias de identificação de aves em campo de Sigrist (2014) e Ridgely et al. (2015), fotografadas e registradas quanto aos seus dados biométricos, biológico e ecológicos (NASCIMENTO et al., 1994) e anilhadas com anilhas do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE) (Anilhador Sênior: Bruno Pereira Berto, registro 5967850; Anilhador Junior: Lucas de Assis Silva Andrade, registro 7161149) (Figura 3). Após este processamento inicial, as aves foram transferidas para caixas de papelão que são tradicionalmente utilizadas para o comércio de aves de pequeno e médio porte. Estas caixas foram de diferentes dimensões para acondicionar aves de diversos portes e previamente forradas com papel absorvente objetivando-se obter as defecações isoladas para a quantificação de OoPD (oocistos por defecação). Após a obtenção das amostras fecais, as aves foram, em seguida, libertadas no próprio ambiente de capturas. Em média, o tempo de acondicionamento para a defecação variou entre 30min até 60min.



Figura 2. Redes de neblina para captura de aves silvestre na Ilha da Marambaia.

Toda metodologia foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) de nº 45200, 49605 e 54951 e Comissão de Ética CEUA/UFRRJ protocolos IV-036/2014, IB-008/2015 e IV-6606250616.



Figura 3. Fotografia e anilhamento de aves silvestres na Ilha da Marambaia.

As amostras fecais foram transportadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e foram incubadas em tubos de centrífuga e regularmente oxigenadas por agitação, à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 10 dias ou até $\sim 70\%$ dos oocistos estarem esporulados. Os tubos de 15 ml continham a relação de 1/6 de fezes para 5/6 de solução aquosa de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 2,5%. Este conservador prioriza o desenvolvimento e identificação de oocistos de coccídios, e também permite a conservação e identificação de cistos de protozoários flagelados e ameboides e larvas e ovos de helmintos.

Após a esporulação dos oocistos, os parasitas foram separados da solução contendo as fezes e o K₂Cr₂O₇ pela técnica modificada de flutuação com solução saturada de sacarose (500g sacarose, 350ml água) via centrifugação (5min a 2.000 rpm) descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynski e Wilber (1997) (Figura 4). As amostras fecais passam pelo processo de suspensão em água destilada nos tubos de centrífuga, repetidamente, visando retirar o excesso de dicromato de potássio. Após esse procedimento, as amostras foram diluídas em solução de sacarose e, novamente, foram centrifugadas. Depois da centrifugação, o conteúdo do tubo é elevado com mais uma porção de solução de sacarose até o seu limite da abertura, formando um menisco convergente, onde é depositada uma lamínula por 5 a 10 min (Figura 4). Através da diferença de densidade contida na solução saturada de sacarose os oocistos se deslocam para extremidade superior do tubo, entrando em contato com a lamínula. Após este período, a lamínula, contendo os oocistos, é retirada e colocada cuidadosamente na superfície de uma lâmina de microscópio. A visualização e as fotomicrografias foram realizadas utilizando microscópio binocular Olympus BX (Olympus Ótico, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália), em objetiva de 100X com de óleo de imersão (Figura 4).

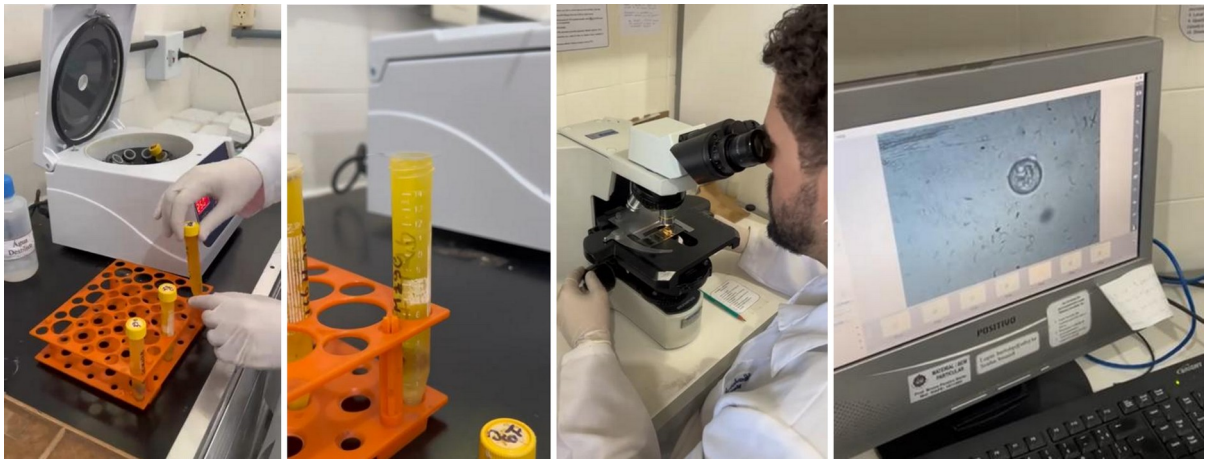


Figura 4. Processamento para recuperação, observação e fotomicrografia (da esquerda para a direita) de oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Após os oocistos serem fotomicrografados, iniciou-se a etapa de identificação das espécies, utilizou-se como base as diretrizes e estudos morfológicos e morfométricos

destacados por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014) que auxiliam na classificação dos oocistos esporulados de coccídios. As características morfológicas utilizadas para a identificação e organização sistemática dos gêneros *Isoospora* e *Eimeria* são: presença e número de esporocistos e esporozoítos; parede do oocisto; micrópila e/ou capuz polar; grânulo polar e/ou resíduo do oocisto; corpos de Stieda, sub-Stieda e para-Stieda; resíduo do esporocisto; corpo refrátil, núcleo e estrias no esporozoíto. Dentre as características morfométricas destacamos o diâmetro maior/menor do oocisto e do esporocisto e índices morfométricos, como média do diâmetro do oocisto e do esporocisto, média de espessura da parede e índice morfométrico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aves capturadas e prevalência de coccídios

Durante as expedições realizadas na Ilha da Marambaia, foram capturadas e identificadas 274 aves, divididas em 23 famílias e 59 espécies (Figura 5). A Tabela 1 apresenta a relação completa das aves capturadas e identificadas, com suas respectivas prevalências e densidades de oocistos nas amostras fecais, organizadas por ordens, famílias e espécies hospedeiras e período de coleta.

A ordem Passeriformes foi a mais representativa, com 15 famílias ao total, 46 espécies e 229 espécimes contabilizadas. Do total de aves capturadas as famílias com maior representatividade foram Thraupidae com 27,4% (75/274), seguida pelas famílias Tyrannidae que obtiveram 21,2% (58/274), Turdidae com 16,4% (45/274), Columbidae com 8,4% (23/274), Vireonidae com 7,7% (21/274) e Alcedinidae com 5,1% (14/274). O restante das famílias obteve representatividade menor do que 5% da totalidade das aves capturadas (Figura 5).

Ao todo foram identificadas 26 espécies de coccídios já descritas na literatura e 10 morfotipos com possibilidades de descrições de novas espécies.

A ocorrência dessas aves na região de Mata Atlântica na Ilha da Marambaia pode ser atribuída ao seu comportamento alimentar predominantemente insetívoro, conforme observado nas famílias deste estudo (SICK, 1997; DOLNIK, 2010). A maioria das áreas onde as aves foram capturadas e coletadas estava cercada por árvores da Mata Atlântica, que foram alvo de reflorestamento. Além disso, a presença abundante de insetos, como as formigas de correição, pode favorecer o hábito alimentar dessas espécies.

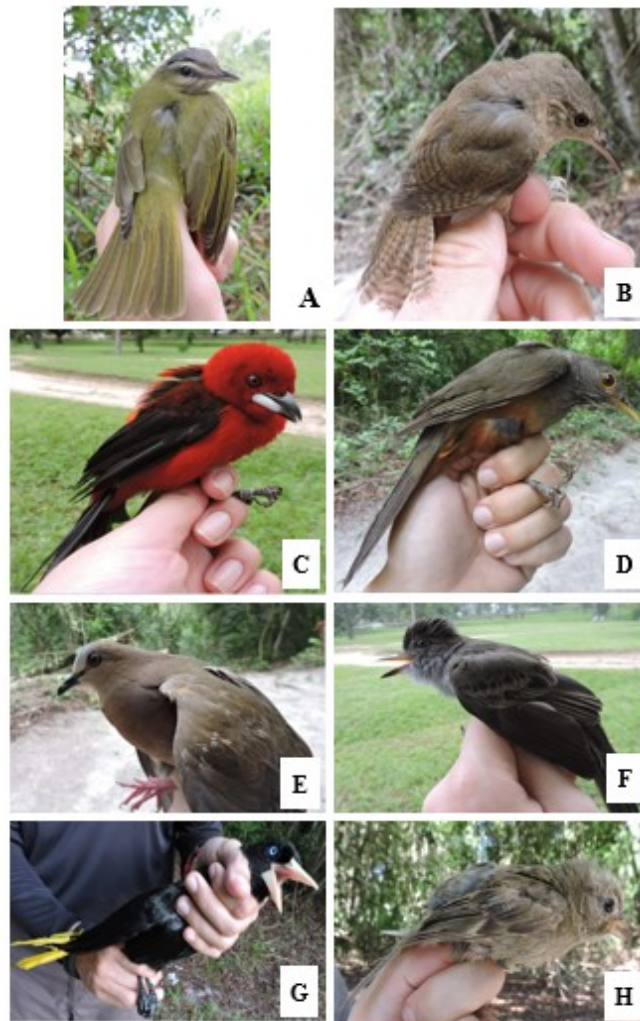


Figura 5. Espécimes de aves capturados na Ilha da Marambaia, RJ. A. *Vireo chivi*; B. *Troglodytes musculus*; C. *Ramphocelus bresilia*; D. *Turdus rufiventris*; E. *Leptotila rufaxilla*; F. *Myiarchus ferox*; G. *Psarocolius decumanus*; H. *Passer domesticus*.

Tabela 1. Prevalência e densidade de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* em amostras fecais de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, organizados por ordem, família e espécie e período de coleta.

Ordens/ Famílias/ Espécies	<i>Eimeria</i> ou <i>Isospora</i>				Total
	Positivo*		Negativo		
	Manhã**	Tarde	Manhã	Tarde	
Apodiformes: Trochilidae					
<i>Chrysuronia versicolor</i> (Vieillot, 1818)	0	0	1	0	1
Subtotais:	0	0	1	0	1
Columbiformes: Columbidae					
<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1811)	0	0	3	3	6
<i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	0	0	0	4	4
<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855	1 (190)	4 (261±329)	1	7	13
Subtotais:	1 (190)	4 (261±329)	4	14	23
Coraciiformes: Alcedinidae					
<i>Chloroceryle amazona</i> (Latham, 1790)	0	0	0	1	1
<i>Chloroceryle americana</i> (Gmelin, 1788)	0	1 (12)***	3	8	12
<i>Megaceryle torquata</i> (Linnaeus, 1766)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	1 (12)	3	10	14
Cuculiformes: Cuculidae					
<i>Crotophaga ani</i> (Linnaeus, 1758)	0	0	1	1	2
Subtotais:	0	0	1	1	2
Passeriformes: Dendrocolaptidae					
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i> (Vieillot, 1818)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	0	1	1
Passeriformes: Furnariidae					
<i>Furnarius figulus</i> (Lichtenstein, 1823)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	0	1	1
Passeriformes: Hirundinidae					
<i>Progne chalybea</i> (Gmelin, 1789)	0	0	5	0	5
Subtotais:	0	0	5	0	5
Passeriformes: Icteridae					
<i>Molothrus bonariensis</i> (Gmelin, 1789)	1 (30)	0	0	0	1
<i>Psarocolius decumanus</i> (Pallas, 1769)	0	1 (362)	0	0	1
Subtotais:	1 (30)	1 (362)	0	0	2
Passeriformes: Passerellidae					
<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	0	0	1	0	1
Subtotais:	0	0	1	0	1
Passeriformes: Passeridae					
<i>Passer domesticus</i> (Linnaeus, 1758)	0	2 (93±83)	0	0	2
Subtotais:	0	2 (93±83)	0	0	2
Passeriformes: Pipridae					
<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)	0	0	1	5	6
<i>Manacus manacus</i> (Linnaeus, 1766)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	1	6	7
Passeriformes: Rhynchocyclidae					
<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi, 1846	0	0	0	1	1
<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis, 1846	0	0	0	3	3
Subtotais:	0	0	0	4	4
Passeriformes: Thamnophilidae					

<i>Herpsilochmus rufimarginatus</i> (Temminck, 1822)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	0	1	1
Passeriformes: Thraupidae					
<i>Coereba flaveola</i> Linnaeus, 1758	0	2 (66±36)	1	3	6
<i>Dacnis cayana</i> (Linnaeus, 1766)	0	5 (190±217)	0	7	12
<i>Emberizoides herbicola</i> (Vieillot, 1817)	0	1 (5)	0	0	1
<i>Ramphocelus bresilia</i> (Linnaeus, 1766)	0	19 (296±726)	7	12	38
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	1 (13)	1 (35)	2	0	4
<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1822)	0	1 (4)	0	0	1
<i>Thraupis palmarum</i> (Wied, 1821)	0	3 (127±200)	1	3	7
<i>Thraupis sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	0	4 (3118±5596)	0	0	4
<i>Volatinia jacarina</i> (Linnaeus, 1766)	0	1 (51)	0	1	2
Subtotais:	1 (13)	37 (531±1930)	11	26	75
Passeriformes: Tityridae					
<i>Pachyrhamphus polychopterus</i> (Vieillot, 1818)	0	0	1	2	3
Subtotais:	0	0	1	2	3
Passeriformes: Troglodytidae					
<i>Troglodytes musculus</i> Naumann, 1823	1 (154)	0	0	2	3
Subtotais:	1 (154)	0	0	2	3
Passeriformes: Turdidae					
<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	0	1 (46)	0	0	1
<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	0	1 (4)	1	8	10
<i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	0	0	3	1	4
<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	0	4 (18±20)	3	4	11
<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	0	2 (45±57)	3	14	19
Subtotais:	0	8 (27±30)	10	27	45
Passeriformes: Tyrannidae					
<i>Attila rufus</i> (Vieillot, 1819)	0	0	0	2	2
<i>Camptostoma obsoletum</i> (Temminck, 1824)	0	0	1	0	1
<i>Elaenia chiriquensis</i> Lawrence, 1865	0	0	0	1	1
<i>Elaenia flavogaster</i> (Thunberg, 1822)	0	0	2	3	5
<i>Elaenia mesoleuca</i> (Deppe, 1830)	0	0	1	1	2
<i>Empidonomus varius</i> (Vieillot, 1818)	0	0	1	0	1
<i>Fluvicola nengeta</i> (Linnaeus, 1766)	0	0	0	1	1
<i>Lathrotriccus euleri</i> (Cabanis, 1868)	0	0	0	1	1
<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	0	2 (368±518)	9	8	19
<i>Myiodynastes maculatus</i> (Statius Muller, 1776)	0	0	0	2	2
<i>Myiozetetes cayanensis</i> (Linnaeus, 1766)	0	0	1	0	1
<i>Myiozetetes similis</i> (Spix, 1825)	1 (1)	1 (1)	1	2	5
<i>Phyllomyias fasciatus</i> (Thunberg, 1822)	0	0	0	3	3
<i>Phyllomyias virescens</i> (Temminck, 1824)	0	0	0	2	2
<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	0	0	1	8	9
<i>Tyrannus melancholicus</i> Vieillot, 1819	0	0	1	2	3
Subtotais:	1	3 (246±423)	18	36	58
Passeriformes: Vireonidae					
<i>Cyclarhis gujanensis</i> (Gmelin, 1789)	0	0	0	1	1
<i>Vireo chivi</i> (Vieillot, 1817)	5 (52±65)	7 (48±60)	4	4	20
Subtotais:	5 (52±65)	7 (48±60)	4	5	21
Pelecaniformes: Ardeidae					
<i>Egretta thula</i> (Molina, 1782)	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	0	1	1

Piciformes: Picidae					
<i>Veniliornis maculifrons</i> (Spix, 1824)	0	0	1	0	1
Subtotais:	0	0	1	0	1
Strigiformes: Strigidae					
<i>Athene cunicularia</i> (Molina, 1782)	0	0	2	0	2
Subtotais:	0	0	2	0	2
Trogoniformes: Trogonidae					
<i>Trogon viridis</i> Linnaeus, 1766	0	0	0	1	1
Subtotais:	0	0	0	1	1
Total: 10 (65±74) 63 (358±1491) 64 137 274					

*Número de positivos seguido de densidade média e desvio padrão entre parênteses; **Período de coleta de amostras fecais pela manhã (6h-12h) ou tarde (13h-18h); ****Amostra positiva por pseudoparasitismo de *Eimeria* sp.

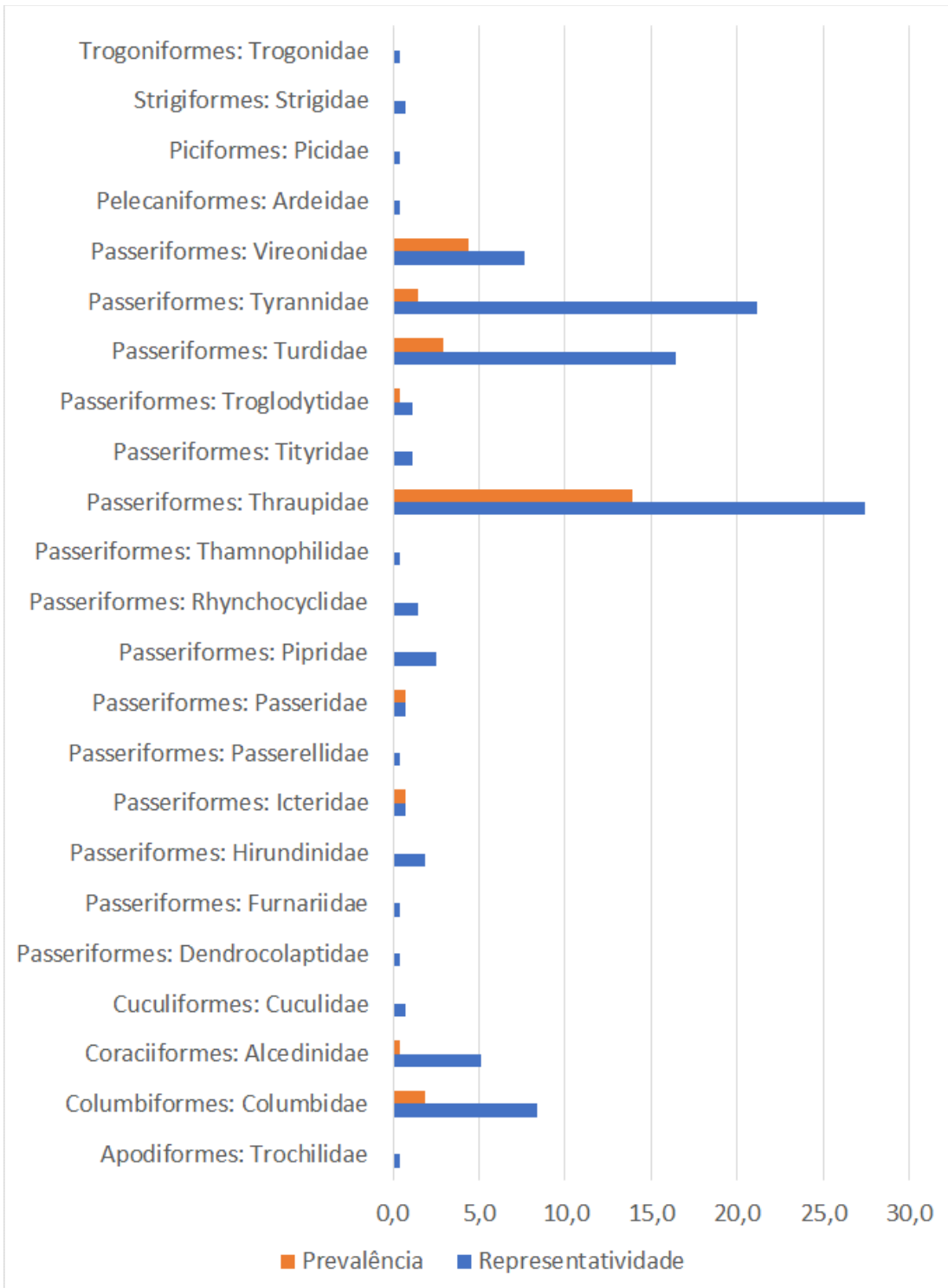


Figura 6. Representatividade das famílias de aves (azul) com suas respectivas prevalências de coccídios (laranja) (ambos em porcentagem) na Ilha da Marambaia, RJ.

Após a coleta e análise das amostras provenientes das 274 aves, identificou-se a presença de coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* em algumas delas (Tabela 1). É relevante notar que as aves capturadas aparentavam estar em bom estado de saúde, inclusive aquelas que estavam parasitadas por coccídios.

A prevalência geral de oocistos encontrados nas amostras coletadas foi de 26,6% (73/274). Notavelmente, dentre as 23 famílias distintas de aves cujas espécimes foram capturadas e identificadas na Ilha da Marambaia, apenas 9 foram positivas para infecções por coccídios, liberando oocistos dos gêneros *Isospora* ou *Eimeria*. A maior prevalência foi observada na família Vireonidae com 57,1% (12/21), seguida das famílias Thraupidae com 50,7% (38/75), Columbidae com 21,7% (5/23), Turdidae com 17,8% (8/45), Alcedinidae com 7,1% (1/14) e Tyrannidae com 6,9% (4/58). Nesta constatação, não foram consideradas as famílias que tiveram apenas dois espécimes capturados, as quais foram as famílias Troglodytidae, Passeridae e Icteridae. As demais famílias não apresentaram espécimes positivos para coccídio.

A figura 5 mostra um gráfico com a representatividade das famílias de aves capturadas juntamente com suas respectivas prevalências. É possível notar que, embora algumas famílias apresentem elevada prevalência de positivos, ao mesmo tempo, foram pouco representativas em número de espécimes capturados, como no caso de Vireonidae, Troglodytidae, Passeridae e Icteridae.

4.2. Distribuição dos coccídios nas famílias de aves

As famílias positivas para coccídios de *Eimeria* e *Isospora* foram Columbidae, da ordem Columbiformes, e Icteridae, Passeridae, Thraupidae, Turdidae, Tyrannidae e Vireonidae, de Passeriformes. A figura 6 mostra fotomicrografias de oocistos esporulados de coccídios identificados de amostras fecais de aves capturadas na Ilha da Marambaia. A família dos martins-pescadores Alcedinidae, de Coraciiformes, foi positiva para um *Eimeria* sp. pseudoparasita, potencialmente parasita de um peixe ou invertebrado ingerido por *C. americana*, conforme abordado no capítulo dois deste trabalho.

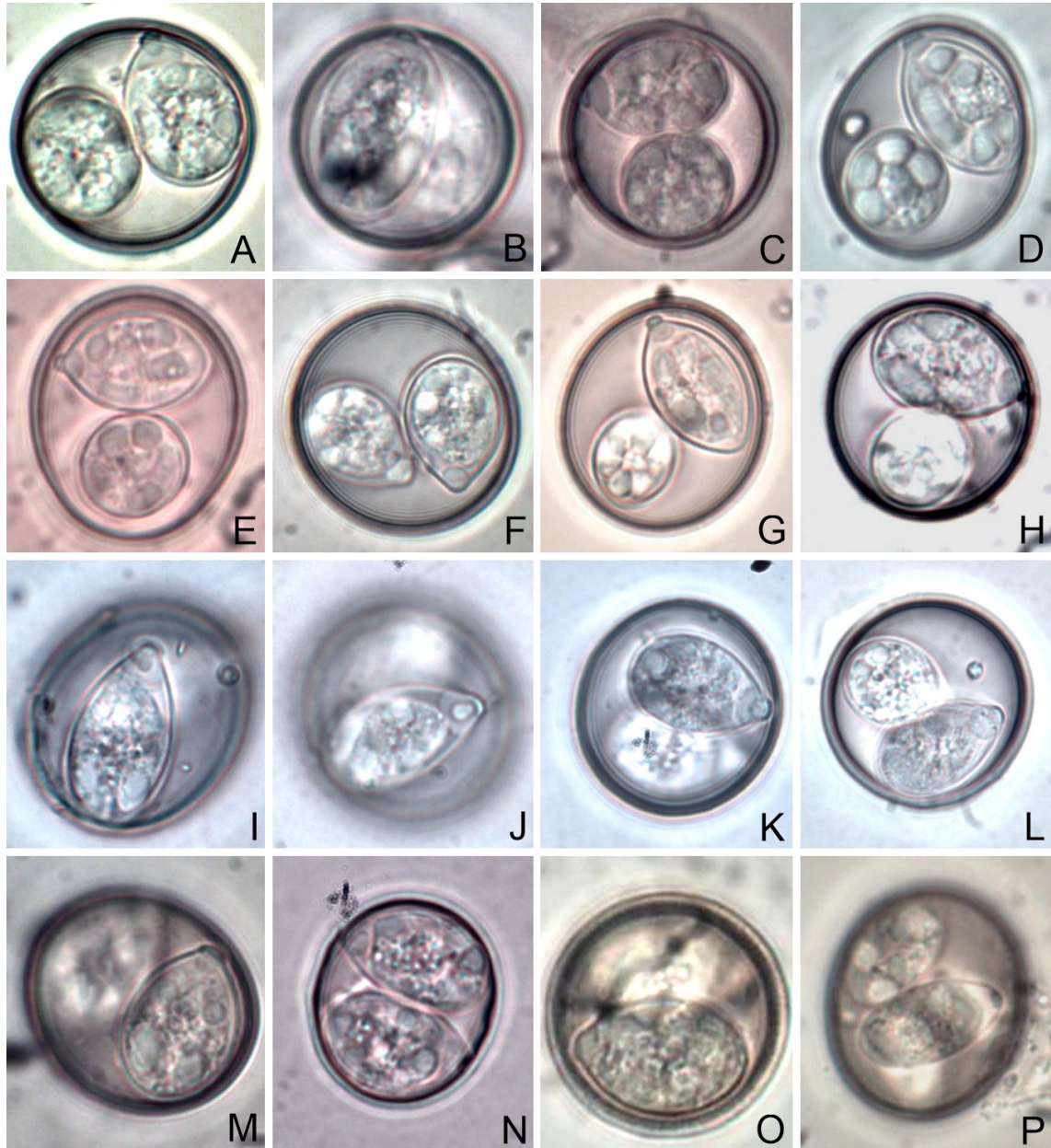


Figura 7. Fotomicrografias de oocistos esporulados de coccídios identificados de amostras fecais de aves capturadas na Ilha da Marambaia, RJ: A. *Isoospora cadimi* de *Ramphocelus bresilia*; B. *Isoospora navarroi* de *R. bresilia*; C. *Isoospora ramphoceli* de *R. bresilia*; D. *Isoospora sepetibensis* de *R. bresilia*; E. *Isoospora sepetibensis* de *Emberizoides herbicola*; F. *Isoospora pitiguari* de *Vireo chivi*; G. *Isoospora juruviaerae* de *V. chivi*; H. *Isoospora graceannae* de *Molothrus bonariensis*; I. *Isoospora spratti* de *Passer domesticus*; J. *Isoospora fatiguei* de *P. domesticus*; K. *Isoospora michaelbakeri* de *P. domesticus*; L. *Isoospora gonnetae* de *P. domesticus*; M. *Isoospora cetasiensis* de *Sicalis flaveola*; N. *Isoospora massardi* de *Turdus albicollis*; O. *Isoospora ferox* de *Myiarchus ferox*; P. *Eimeria ferreirai* de *Leptotila verreauxi*. Magnificação de 1000x.

Os tópicos a seguir trazem as identificações específicas em cada família de aves positivas.

4.2.1. Columbidae

Das três espécies capturadas de Columbidae, apenas *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 foi positiva para *Eimeria ferreirai* Oliveira & Berto, 2020, a qual é uma espécie recentemente descrita na Ilha da Maramabia por Oliveira et al. (2020) (Tabela 2). Além desta, um morfotipo não relacionado na literatura científica foi também observado em uma das amostras de *L. verreauxi* (Tabela 2), o qual foi codificado como “morfotipo c122m4” até que se proceda com a confirmação e descrição de nova espécie.

Tabela 2. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Columbidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas		Total ¹
	<i>Eimeria</i> sp. (morfotipo c122m4)	<i>E. ferreirai</i>	
<i>L. verreauxi</i>	1	4	2
Total ²	1	4	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.2. Icteridae

Os dois icterídeos capturados no presente trabalho foram positivos para *Isospora* spp. A maior diversidade foi observada em um chupim *M. bonariensis*, o qual foi positivo para oocistos morfologicamente compatíveis com a espécie *Isospora graceannae* Upton & Whitaker, 2000 e *Isospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Tabela 3). *Isospora bellicosa* foi recentemente relatada de guaxes *Cacicus haemorrhous* (Linnaeus, 1766) no Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil (Silva et al. 2017), tornando esta identificação ecologicamente fundamentada. Em contrapartida, *I. graceannae* foi unicamente relatada na sua descrição original em cativeiro no Aquário Nacional de Maryland, USA. Seu

hospedeiro-tipo, *Icterus graceannae* Cassin, 1867, distribuiu-se naturalmente de forma restrita na região transandina, no Equador e Peru. Neste sentido, em decorrência da dispersão antrópica de *I. graceannae* em cativeiro, além das várias espécies de Icteridae de ampla distribuição geográfica na região neotropical, a identificação de *I. graceannae* neste trabalho torna-se sustentada (Silva et al. 2017; Berto & Lopes, 2020). O segundo hospedeiro icterídeo deste trabalho foi o japu *Psarocolius decumanus* (Pallas, 1769), o qual também foi positivo para *I. bellicosa* (Tabela 3).

Tabela 3. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Icteridae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas		
	<i>I. graceannae</i>	<i>I. bellicosa</i>	Total ¹
<i>M. bonariensis</i>	1	1	2
<i>P. decumanus</i>	0	1	1
Total ²	1	2	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.3. Passeridae

Um pardal *Passer domesticus* (Linnaeus, 1758) capturado na Ilha da Marambaia foi positivo para sete das 12 espécies pioneiramente descritas por Grulet et al. (1982). Neste trabalho, os coccídios de *P. domesticus*, na França, foram morfológicamente estudados em detalhes minuciosos, os quais fundamentaram os estudos taxonômicos posteriores dos coccídios de Eimeriidae.

Apesar do número limitado de oocistos observados em apenas duas amostras positivas (152 e 34 oocistos) (Tabela 1), foi possível identificar oocistos compatíveis com *Isospora fatigui* Grulet, Landau e Baccam, 1982, *Isospora gonnetae* Grulet, Landau e Baccam, 1982, *Isospora spratti* Grulet, Landau e Baccam, 1982, *Isospora michaelbakeri* Grulet, Landau e Baccam, 1982, *Isospora boxae* Grulet, Landau e Baccam, 1982, *Isospora kouyatei* Grulet, Landau e Baccam, 1982 e *Isospora frenkeli* Grulet, Landau e Baccam, 1982 (Tabela 4).

Tabela 4. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Passeridae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas							Total ¹
	<i>I. fatigueti</i>	<i>I. gonnetae</i>	<i>I. spratti</i>	<i>I. michaelbakeri</i>	<i>I. boxae</i>	<i>I. kouyatei</i>	<i>I. frenkeli</i>	
<i>P. domesticus</i>	1	1	1	1	1	1	1	8
Total ²	1	1	1	1	1	1	1	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.4. Thraupidae

Os traupídeos foram as aves com maior diversidade de espécies coccidianas observadas. Além fato dos traupídeos serem essencialmente frugívoros, o qual é o hábito que mais susceptibiliza a transmissão feco-oral dos oocistos de coccídios (DOLNIK et al., 2010), esta família abriga uma grande quantidade de espécies que são subclassificadas em subfamílias.

Em geral, *Isospora* spp. que são majoritariamente estudadas como específicas em nível de família de Passeriformes, tem se mostrado específicas em nível de subfamília dentro da família Thraupidae (BERTO et al., 2011a). Isto pode ser observado na tabela 5, onde, por exemplo, *Isospora cagasebi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2008 e *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010, são restritas de cambacica *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) que pertence a subfamília Coerebinae (BERTO et al., 2008; 2011b; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2022). O mesmo é observado para *Isospora cetasiensis* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino, Lopes, 2011 e *Isospora sicalisi* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino, Lopes, 2011, específicos de canários-da-terra *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766) da subfamília Diglossinae (COELHO et al. 2011). Em contra-partida, algumas espécies, como *Isospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira and Lopes, 2008, que foi a espécie coccidiana mais prevalente neste estudo, presente em 20 das 38 amostras

positivas dos traupídeos (52,6%) e 20 das 73 amostras positivas em geral (27,4%), foi identificada das subfamílias Dacninae, Emberizoidinae e Tachyphoninae.

O tiê-sangue *Ramphocelus bresilia* (Linnaeus, 1766) foi a ave mais representativa neste estudo, com 38 espécimes capturadas. Também foi a espécie com maior prevalência e diversidade de coccídios, com 19 espécimes positivos com quatro *Isospora* spp. distintas: *I. sepetibensis*, *Isospora ramphoceli* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2010, *Isospora cadimi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2009 e *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira e Lopes, 2009. Em comparação, em um levantamento de coccídios de traupídeos na Ilha da Marambaia, *R. bresilia* foi relacionado como hospedeiro de seis *Isospora* spp. distintas, duas a mais que o trabalho presente (BERTO et al. 2011c).

Quatro oocistos de morfotipos distintos não relacionados na literatura científica foram observados de *C. flaveola*, *Dacnis cayana* (Linnaeus, 1766), *Emberizoides herbicola* (Vieillot, 1817), *Thraupis palmarum* (Wied, 1821), *Thraupis sayaca* (Linnaeus, 1766) e *Volatinia jacarina* (Linnaeus, 1766). Estes morfotipos precisam de maior estudo morfológico para potencialmente serem descritos como novas espécies.

Tabela 5. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Thraupidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

		Espécies coccidianas																			
	Hospedeiros	<i>I. coerebae</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c23g25)	<i>I. cagasebi</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo ramphoceli2)	<i>I. tiesangu</i>	<i>I. marambaiensis</i>	<i>I. sepetibensis</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c816a)	<i>I. ramphoceli</i>	<i>I. cadimi</i>	<i>I. navarro</i>	<i>I. cetasiensis</i>	<i>I. sicalisi</i>	<i>I. sanhaci</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c12g6)	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c19i3)	<i>I. silvasouzai</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c7112)	Total ¹	
	<i>C. flaveola</i>		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. cayana</i>		0	0	0	1	4	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>E. herbicola</i>		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>R. bresilia</i>		0	0	0	0	0	0	15	0	11	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. flaveola</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>T. coronatus</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

<i>T. palmarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0	3
<i>T. sayaca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	4
<i>V. incarina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total ²	1	1	1	1	4	2	20	1	12	7	3	2	2	4	2	3	2	1	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.5. Troglodytidae

A família Troglodytidae foi representada por apenas uma espécie durante as capturas, *Troglodytes musculus* Naumann, 1823, sendo que dos três espécimes capturados, apenas um estava positivo para *Isospora* sp. (morfotipo 122 m3). Apesar de Lopes et al. (2016) terem descritos *Isospora corruíra*, também na Ilha da Marambaia, os oocistos observados apresentavam morfologias distintas, sugerindo uma possível nova espécie.

4.2.6. Turdidae

Quatro das cinco espécies de sabiás capturadas foram positivas para coccídios. *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 foi a espécie mais prevalente nos sabiás, sendo observada de *Turdus albicollis* Vieillot, 1818, *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850, *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 e *Turdus rufiventris* Vieillot, 1818. *Isospora* spp. de sabiás são razoavelmente bem estudadas através dos trabalhos de Berto et al. (2014), Pinho et al. (2017a; 2017b; 2018), Genovez-Oliveira et al. (2019) e

Oliveira et al. (2019); no entanto, um morfotipo não relacionado na literatura científica foi observado de sabiás-coleira *T. albicollis*, o qual potencialmente deve ser uma nova espécie.

Tabela 6. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Turdidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas				Total ¹
	<i>Isospora</i> sp. (morfotipo c14i7)	<i>I. massardi</i>	<i>I. albicollis</i>	<i>I. sabiai</i>	
<i>T. albicollis</i>	1	1	0	0	2
<i>T. amaurochalinus</i>	0	1	1	1	3
<i>T. leucomelas</i>	0	2	0	2	2
<i>T. rufiventris</i>	0	2	0	1	2
Total ²	1	6	1	4	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.7. Tyrannidae

Apesar da maior diversidade de aves ter sido observada na família Tyrannidae, a prevalência nesta família foi muito baixa. Conforme, já explanado na literatura científica, o hábito predominantemente insetívoro desta família pode estar associado a sua frequente baixa prevalência de coccídios. O hábito de comer insetos, principalmente durante o vôo, é desfavorável para a transmissão feco-oral dos oocistos de coccídios. Das 16 espécies de tiranídeos capturadas, apenas duas foram positivas: *Myiarchus ferox* (Gmelin, 1789) e *Myiozetetes similis* (Spix, 1825).

Isospora feroxis Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 foi bem detalhada na literatura científica (BERTO et al. 2009; ORTÚZAR-FERREIRA et al. 2021); entretanto, *Isospora attilae* Rodrigues, Silva, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 foi apenas originalmente descrita de *Attila rufus* (Vieillot, 1819) na Ilha da Marambaia e, portanto, *M. ferox* torna-se um novo hospedeiro para esta espécie coccidiana.

Dois bentevizinhos-de-penacho-vermelho *M. similis* foram positivos para oocistos de *Isospora* sp. com uma morfologia na relatada previamente, a qual foi codificada como

“morfofoto c124m30”. Portanto, este morfofoto deve potencialmente tratar-se de uma nova espécie.

Tabela 7. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Tyrannidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas			Total ¹
	<i>I. ferox</i>	<i>I. atillae</i>	<i>Isospora</i> sp. (morfofoto c124m30)	
<i>M. ferox</i>	1	1	0	2
<i>M. similis</i>	0	0	2	1
Total ²	1	1	2	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.2.8. Vireonidae

A juruviara *V. chivi* foi amplamente abordada no capítulo 3 desta tese, através da descrição da nova espécie *Isospora juruviarae* Andrade & Berto, 2023 (ANDRADE et al. 2024). No entanto, além desta, foram observados oocistos compatíveis com *Isospora pitiguari* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 em 5 juruviaras, tornando *V. chivi* como um novo hospedeiro para esta espécie coccidiana (LOPES et al. 2014).

Tabela 8. Relação das espécies coccidianas identificadas em aves silvestres da família Vireonidae capturadas na Ilha da Marambaia, RJ.

Hospedeiros	Espécies coccidianas		Total ¹
	<i>I. pitiguari</i>	<i>I. juruviarae</i>	
<i>V. chivi</i>	5	9	2
Total ²	5	9	

¹Total de espécies coccidianas (diversidade) identificada em cada espécie hospedeira.

²Total de amostras positivas por espécies coccidiana.

4.3. Densidades de coccídios e periodicidade de eliminação dos oocistos

Após a contagem dos oocistos das amostras positivas pela técnica de OoPD (DOLNIK, 2006), observou-se as maiores densidades de um sanhaço-cinzento *T. sayaca* e um

tiê-sangue *R. bresilia*, onde foram obtidas amostras com OoPD de 11.500 e 3.100. Mesmo nestas maiores densidades de oocistos, as respectivas aves foram aparentemente saudáveis. Conforme mencionado anteriormente, essas aves que têm hábito de alimentação de frugivoria têm maior susceptibilidade à transmissão de coccídios, o que deve estar associado a essas densidades mais altas (DOLNIK et al., 2010).

Em comparação com aves silvestres em ambientes impactados, mantidas em cativeiro ou recuperadas do tráfico ilegal, onde a coccidiose tende a ser severa e as densidades bastante altas, pode-se considerar que as densidades obtidas neste estudo são baixas ou moderadas (BERTO & LOPES, 2020). Desta forma, pensa-se que apesar da pequena urbanização e antropização da Ilha da Marambaia pelo Corpo de Fuzileiros Navais da Marinha do Brasil, além da população nativa da ilha, a qual poderia predispor as aves à sinais clínicos e altas densidades de coccídios, as aves parecem manter uma relação parasita-hospedeiro estável que não alteram suas condições de saúde.

Além dessas observações sobre as maiores prevalências e densidades em certas aves, observou-se que a maioria das amostras positivas e com densidades mais elevadas foram coletadas no período da tarde (13h até 18h). Após a avaliação estatística, a maior prevalência no período da tarde foi significativamente confirmada, com uma probabilidade de obter-se amostras positivas para coccídios no período da tarde três vezes maior do que no período da manhã (6h até 12h) (Tabela 9).

Tabela 9. Prevalência de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, em relação ao período de coleta de amostras fecais.

Período	Prevalência* de coccídios (<i>Eimeria</i> ou <i>Isospora</i>)			
	+/N (%)	OR	IC95%	p-valor
Manhã (6h até 12h)	10/74 (13,5%)	Ref.		
Tarde (13h até 18h)	63/137 (46,0%)	2,9431	1,4180-6,1084	0,0046

Comparações estatísticas feitas pela Odds Ratio*. +: Número de animais positivos; N: número de amostras; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Ref.: variável usada como valor de referência

Em contraste, as maiores densidades observadas no período da tarde não foram significativamente diferentes do período da manhã. Essa não significância pode estar relacionada ao baixo número de amostras positivas coletadas pela manhã (Tabela 10).

Tabela 10. Densidade de coccídios dos gêneros *Eimeria* ou *Isospora* de aves silvestres capturadas na Ilha da Marambaia, RJ, em relação ao período de coleta de amostras fecais.

Período	Densidade* de coccídios (<i>Eimeria</i> ou <i>Isospora</i>)		
	Média	DP	<i>p</i> -valor
Manhã (6h até 12h)	65	74	0,4953
Tarde (13h até 18h)	358	1491	

Comparações estatísticas feitas pelo teste de Mann-Whitney*. DP: desvio padrão

Essas observações estão de acordo com os estudos de López et al.(2007), Martinaud et al. (2009), Dolnik et al. (2010), Morin-Adeline et al.(2011) e Biard et al. (2022) que relatam que os coccídios de pássaros têm uma periodicidade de eliminação de oocistos, tendendo a eliminar mais oocistos nas últimas horas do dia. Até o presente momento, esta dinâmica de eliminação de oocistos tem sido associada às vantagens da transmissão durante o pico da atividade alimentar da tarde e à proteção da radiação solar ultravioleta (LÓPEZ et al., 2007; MARTINAUD et al., 2009; BIARD et al. 2022).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.A.S.; ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; OLIVEIRA, M.S.; CARDOZO, S.V.; LIMA, V.M.; BERTO, B.P. *Isospora juruviarae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from Chivi vireos *Vireo Chivi* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Vireonidae) in South America. *Parasitology International*, v. 98, p. 102806, 2024.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H. B.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Isospora cagasebi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the bananaquit, *Coereba flaveola* of Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 53, p. 117-119, 2008.
- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H. R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora coerebae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Passeriformes:

- Coerebidae) in South America. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, p. 22-26, 2011b.
- 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*, v. 80, p. 159–204, 2011a.
- BERTO, B.P.; LOPES, B.; LUZ, H.R.; GALVÃO, G.S.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 59, p. 272-275, 2014.
- BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, v. 106, p. 707–713, 2020.
- BERTO, B.P.; LUZ, H. R.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W.L.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. Isosporoid Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) parasites of tanagers (Passeriformes: Thraupidae) from the Marambaia Island, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, p. 798-805, 2011c.
- BERTO, B.P.; LUZ, H.R.; FLAUSINO, W.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. 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*, v. 74, p. 75-80, 2009.
- BIARD, C.; MONCEAU, K.; TEIXEIRA, M.; MOTREUIL, S.; BETTENCOURT-AMARANTE, S.; DEVELAY, L.; MOREAU, J. Coccidial oocyst release: once a day or all day long? Tropical bird hosts shed new light on the adaptive significance of diurnal periodicity in parasite output. *Parasitology*, v. 149(4), p. 469-481, 2022.
- 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 Parasitologica*, v. 56, p. 239-244, 2011.
- DOLNIK, O.V. 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*, v. 100, p. 155–160, 2006.

- DOLNIK, O.V.; DOLNIK, V.R.; BAIRLEIN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, v. 98(1), p. 97-103, 2010.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. 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*, v. 75, 2020
- GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D. Les *Isospora* du moineau domestique; multiplicité des espèces. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 57, 209–233, 1982.
- LOPES, B.B.; BERTO, B.P.; LUZ, H.R.; GALVÃO, G.D.S.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora pitiguari* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae) *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789. *Zootaxa*, v. 3760, p. 96–100, 2014.
- LOPES B.B.; RODRIGUES, M.B.; SILVA, L.M.; BERTO, B.P.; LUZ, R.B.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. A new isosporoid coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from the southern house wren *Troglodytes musculus* Naumann, 1823 (Passeriformes: Troglodytidae) from Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 61(2), p. 425–428, 2016.
- LÓPEZ, G.; FIGUEROLA, J.; SORIGUER, R. Time of day, age and feeding habits influence coccidian oocyst shedding in wild passerines. *International Journal for Parasitology*, v. 37(5), p. 559-564, 2007.
- MARTINAUD, G.; BILLAUDELLE, M.; MOREAU, J. Circadian variation in shedding of the oocysts of *Isospora turdi* (Apicomplexa) in blackbirds (*Turdus merula*): An adaptive trait against desiccation and ultraviolet radiation. *International Journal for Parasitology*, v. 39(6), p. 735-739, 2009.
- MORIN-ADELIN, V.; VOGELNEST, L.; DHAND, N.K.; SHIELS, M.; ANGUS, W.; SLAPETA, J. Afternoon shedding of a new species of *Isospora* (Apicomplexa) in the endangered Regent Honeyeater (*Xanthomyza phrygia*). *Parasitology*, v. 138, (6), p. 713-724, 2011.
- OLIVEIRA, M.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; MARONEZI, C.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, Á.A.; LIMA, V.M.; BERTO, B.P.

- Eimeria ferreirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil. *Zootaxa*, v. 4821, p. 148-160, 2020.
- OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, J.L.G.; RODRIGUES, M.B.; SILVA-CARVALHO, L.M.; ANDRADE, L.A.S.; CARDOZO, S.V.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. *Isospora brasilsatoae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Zootaxa*, v. 4555, p. 433-440, 2019.
- 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. Redescription and the molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Systematic Parasitology*, v. 98, p. 333–341, 2021.
- ORTZAR-FERREIRA, C.N.; ANDRADE, L.A.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, G.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. Molecular identification of *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira amp; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil. *Zootaxa*, v. 5168, p. 83–91, 2022.
- PINHO, I.F.; RODRIGUES, M.B.; SILVA, L.M.; LOPES, B.B.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, M.A.; CARDOZO, S.V.; LUZ, H.R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G.; BERTO, B.P. Characterization and distribution of *Isospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *JOURNAL OF PARASITOLOGY*, v. 103, p. 285-291, 2017b.
- PINHO, I.F.; SILVA, L.M.; RODRIGUES, M.B.; LOPES, B.B.; OLIVEIRA, M.S.; LUZ, H. B.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G.; BERTO, B. P. *Isospora machadoae* sp. nov. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian species from white-necked thrushes *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) of South America. *Zoologia*, v. 35, p. 1-4, 2018.
- PINHO, I.F.; SILVA, L.M.; RODRIGUES, M.B.; LOPES, B.B.; OLIVEIRA, M.S.; LUZ, H. B.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G.; BERTO, B.P. *Isospora albicollis* (Apicomplexa: Eimeriidae) in thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae), in southeastern Brazil. *REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINARIA*, v. 26, p. 231-234, 2017a.

CONCLUSÃO GERAL

Após a obtenção dos resultados dessa tese, pode-se concluir o seguinte:

1. O presente estudo identifica fortes evidências ecológicas, morfológicas e moleculares que sugerem um cenário de pseudoparasitismo desta *Eimeria* sp. de *C. americana* no manguezal da Ilha da Marambaia, cujo verdadeiro hospedeiro é um peixe ou outra presa ingerida pelo martim-pescador-pequeno e depois eliminada em suas fezes.
2. Com base nas características morfológicas e moleculares descritas, *I. coerebae* é relatada no presente trabalho, documentando uma nova localidade na Mata Atlântica brasileira, a RPPN de Porangaba, sudeste do Brasil. Fornecemos também a caracterização genotípica preliminar via sequenciamento de duas regiões do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (COI).
3. Com base nos dados morfológicos e moleculares obtidos dos oocistos isosporanos recuperados de *V. chivi* de três diferentes biomas da Ilha da Marambaia, *I. juruviarae* é considerado novo para a Ciência, sendo a segunda espécie registrado na família hospedeira Vireonidae e o primeiro a ter suplementação por identificação molecular.
4. A prevalência geral de oocistos encontrados nas amostras coletadas em aves na Ilha da Marambaia foi de 26,6% (73/274). Apesar da pequena urbanização e antropização da Ilha da Marambaia pelo Corpo de Fuzileiros Navais da Marinha do Brasil, além da população nativa da ilha, as aves parecem manter uma relação parasita-hospedeiro estável que não alteram suas condições de saúde.

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

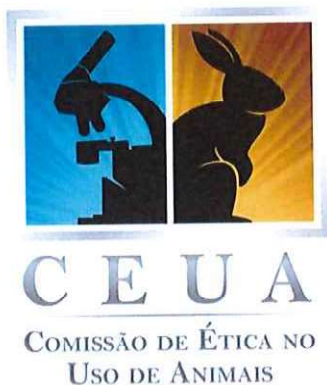


Fabio B. Scott

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

Jonimar Pereira Paiva

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



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

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 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	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.
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 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.
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).

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

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/cgen .
----	---

Outras ressalvas

1	<p>1. Esta autorização não exime 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 ensolarada. 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 vistoriador experiente presente.</p>	CEMAVE Cabedelo-PB
2	<p>- Comunicar ao PARNA S. Bocaina, com antecedência de 15 dias, quando serão feitas coletas/registros/amostragens de dados e informações no interior do Parque e em que localidade; e para solicitar apoio/alojamento, entrar em contato com o Parque com 03 semanas de antecedência.</p> <p>- Encaminhar listagem com a localização georreferenciada dos táxons 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 veiculação.</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 espaciais 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 espaciais das áreas de pesquisas, a pesquisa poderá ser suspensa no SISBIO e as marcações ou objetos das pesquisas serem retirados da mata;</p> <p>- Em todas os trabalhos de campo na REBIO União a equipe de pesquisa deverá comunicar previamente à gestão da UC em quais locais andará 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).



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

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>*Ressalvas 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/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/recomendacoes_biodiversidade_e_covid19_ucs_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 da dados, sugerimos que a/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, cinagético 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 (Chefia 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> <p>acesso de animais nativos que circulam (ex: quatis, primatas, serpentes, artrópodes).</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 dos 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, parnaso@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

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	Piraí-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).

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: 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 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.
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

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 fossilíferos 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 exige 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/cgen .
14	Este documento NÃO exige 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

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



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

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 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 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- μ L PCR reaction was prepared using 3 μ L of genomic DNA (< 1 μ g), 12.5 μ L of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1X), 0.25 μ L of each Primer (0.2 μ M), and 9 μ L 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. *Toxoplasma 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) \times 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) \times 5.6 (5–6) μ m, with L/W ratio of 1.72 (1.5–1.9). Stieda body thin and flattened, 0.5 high \times 1.0 wide. Substieda body rounded, 1.0 high \times 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.

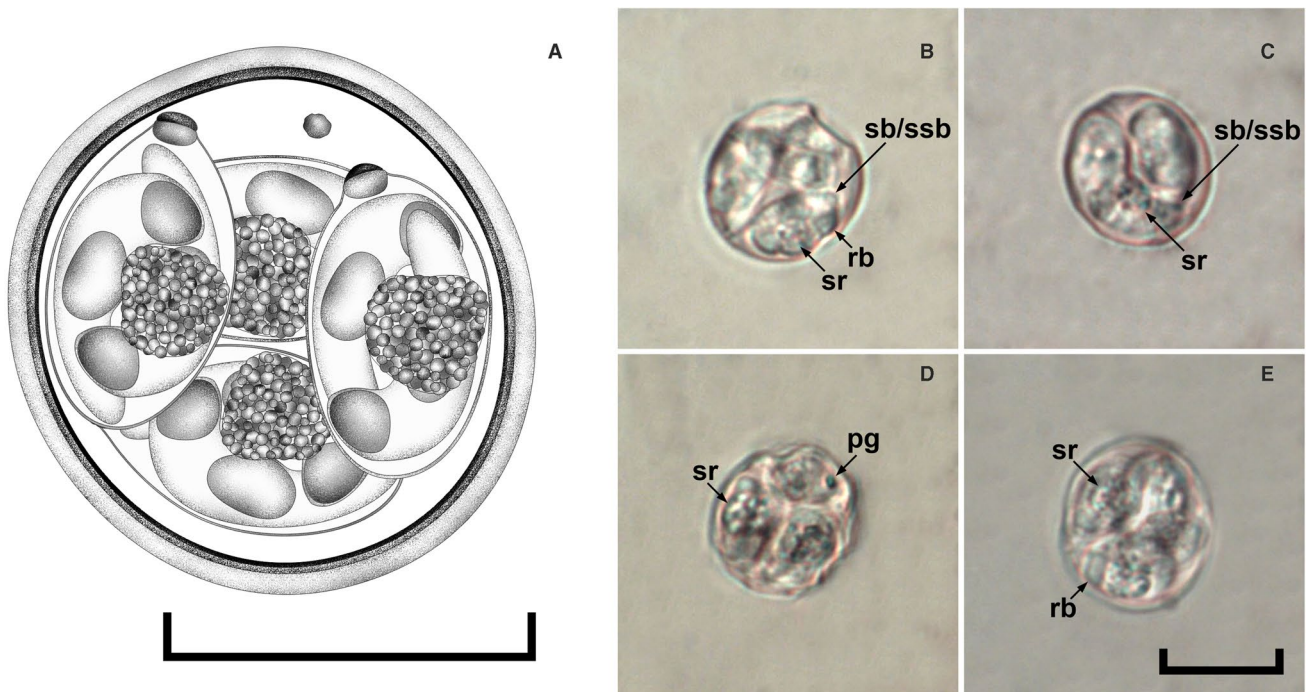


Fig. 1 Composite line drawing (A) and photomicrographs (B–E) of sporulated oocysts of an *Eimeria* sp. recovered from a green kingfisher *Chloroceryle americana*. Note the polar granule (pg); Stieda

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/labioc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, 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 Trefancová 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

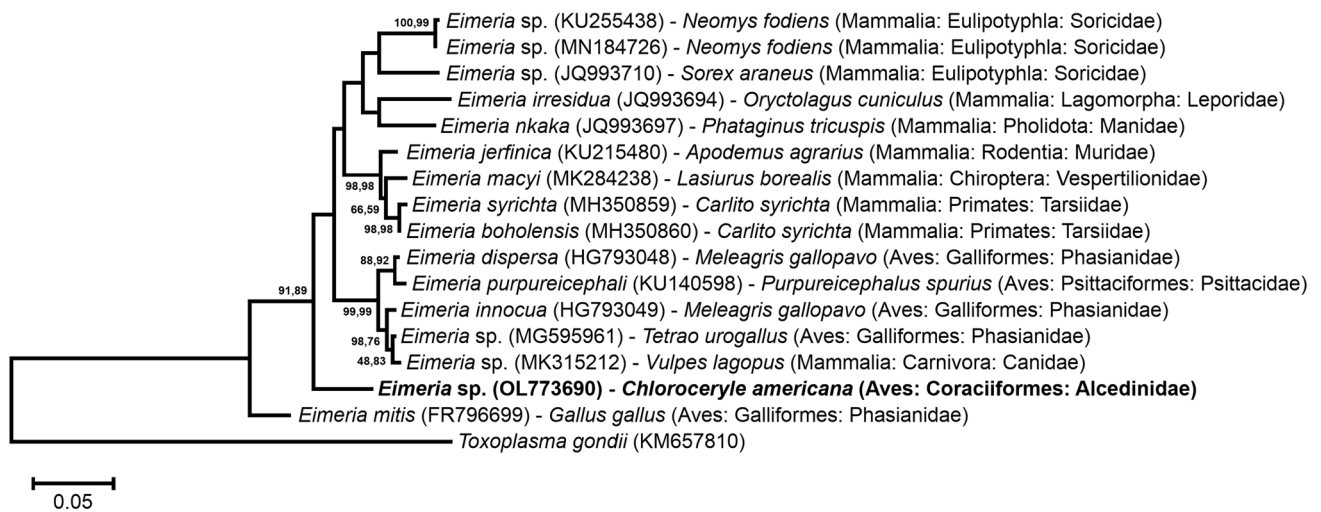


Fig. 2 Maximum likelihood tree estimated from the COI sequences. Numbers at nodes represent bootstrap support (1000 replicates; only values > 50% shown) for neighbor-joining and maximum likelihood,

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). L.A.S.A. has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). J.L.G.-O. has a scholarship from CNPq (Grant/Award Number: 142183/2020–2). M.S.O. has a post-doctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). B.P.B. 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 (*Cariama 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 Eimeriidae. *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) Coccidial 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 AF, 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 AMID (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
- Trefančová 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.



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

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](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](https://orcid.org/0000-0001-8203-9299)

⁴[✉ jhongenovezoliveira30@gmail.com](mailto:jhongenovezoliveira30@gmail.com); [🌐 http://orcid.org/0000-0003-2994-397X](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](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](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](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](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](https://orcid.org/0000-0001-7930-8312)

¹¹[✉ guaratibanofeliz@gmail.com](mailto:guaratibanofeliz@gmail.com); [🌐 https://orcid.org/0000-0002-6128-5789](https://orcid.org/0000-0002-6128-5789)

*Corresponding author. [✉ bertobp@ufrj.br](mailto:bertobp@ufrj.br); [🌐 https://orcid.org/0000-0002-1072-5254](https://orcid.org/0000-0002-1072-5254)

Abstract

Isospora 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 *Isospora* spp. from Southeastern Brazil, but also from *Isospora* 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, *Isospora*, 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 *Isoospora* 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, *Isoospora 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'-GGGCACATCATATGATGAC-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.ufrj.br/labicoc/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.

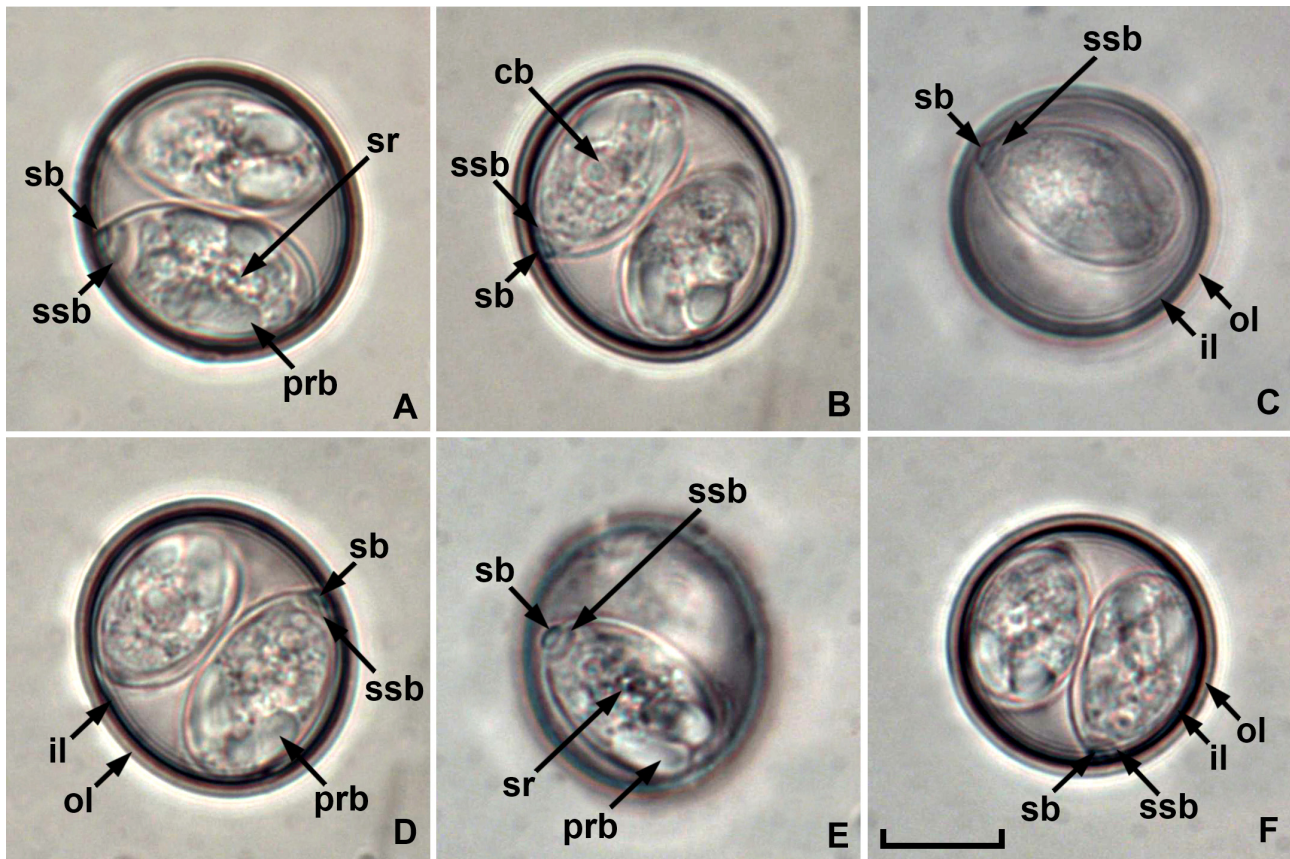


FIGURE 1. Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora coerebae*, a coccidium species recovered from the bananaquit *Coereba flaveola* from Southeastern Brazil. Note the posterior refractile body (prb), crystalloid body (cb), inner (il) and outer (ol) layer of the oocyst wall, sporocyst residuum (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					Polar granule			
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall		Residium	Micropyle	
<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)	21–26 (23.3)	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					Residium			
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body		Substieda body		
<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 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 prominent and rounded	short and wide short and wide	present, scattered granules present, scattered granules	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	present, scattered granules	present, scattered granules	

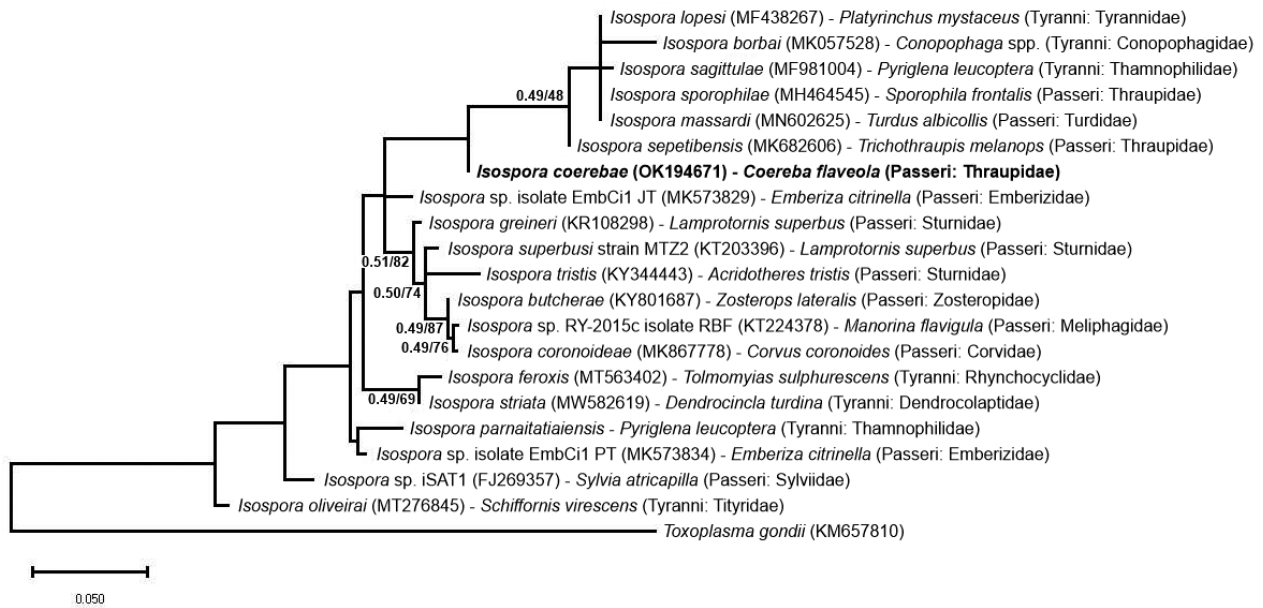


FIGURE 2. Maximum likelihood tree estimated from the COI1 gene sequences of coccidian species. Numbers at the nodes show posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis/bootstrap values derived from Maximum Likelihood analysis. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

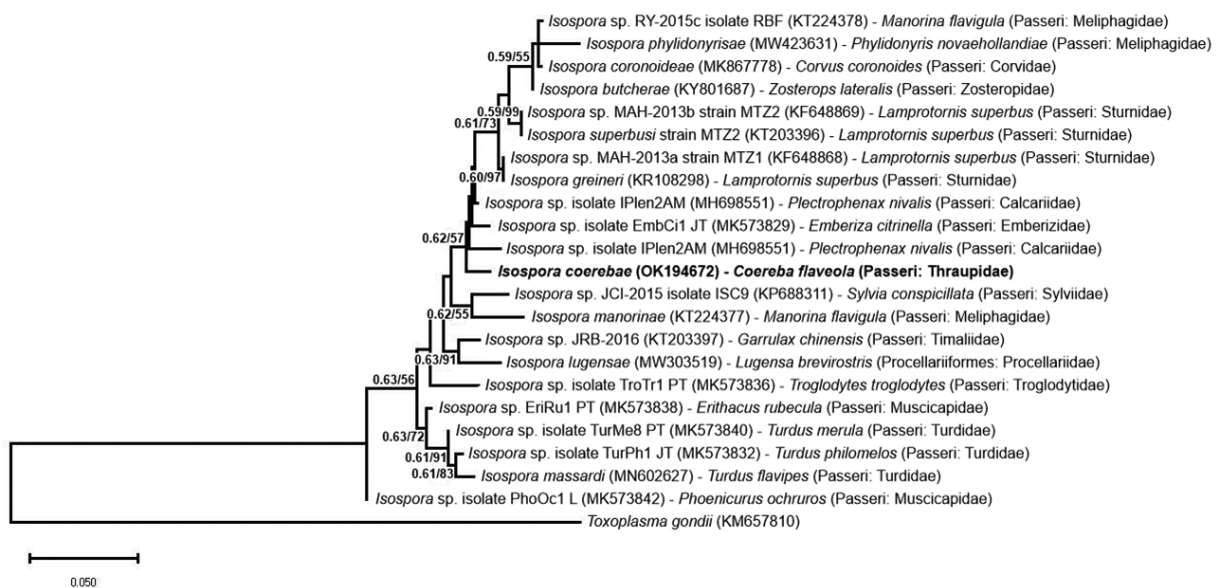


FIGURE 3. Maximum likelihood tree estimated from the COI2 gene sequences of coccidian species. Numbers at the nodes show posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis/bootstrap values derived from Maximum Likelihood analysis. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions 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 radiations 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

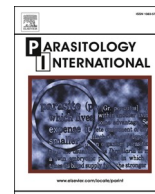
We are thankful to staff at the Private Natural Heritage Reserve Porangaba, mainly to the the owner Dr. Jürgen

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) *Isoospora 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 *Isoospora* 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 *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>
- Duszynski, D.W. & Wilber, P. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *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 *Isoospora sepetibensis* (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from a new host, *Trichothraupis melanops* (Passeriformes: Thraupidae: Tachyphoninae) 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 *Isoospora 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 *Isoospora* 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. 1ª 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 *Isoospora* 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 *Isoospora striata* McQuiston 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 *Isoospora 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 *Isoospora 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 (*Isoospora* 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) *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>
- Yang, R., Brice, B., Oskam, C., Zhang, Y., Brigg, F., Berryman, D. & Ryan, U. (2017) Characterization of two complete *Isoospora* mitochondrial genomes from passerine birds: *Isoospora serinuse* in a domestic canary and *Isoospora manorinae* in a yellow-throated miner. *Veterinary Parasitology*, 237, 137–142.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.027>



Isoospora juruviarae n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from chivi vireos *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Vireonidae) in South America

Lucas de Assis Silva Andrade^a, Carlos Nei Ortúzar-Ferreira^a, Mariana de Souza Oliveira^a, Sergian Vianna Cardozo^b, Viviane Moreira de Lima^c, Bruno Pereira Berto^{c,*}

^a 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

^b Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, 25071-202 Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

^c 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

ARTICLE INFO

Keywords:

Coccidia
Oocysts
Morphology
Taxonomy
Sequencing
Phylogeny
Neotropical birds
Marambaia Island
Brazil

ABSTRACT

Chivi vireos *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) are passerine birds widely distributed throughout Brazil, but mainly observed in the Atlantic Forest of the South and Southeast regions of the country. In this context, the current study identifies a new species of *Isoospora* Schneider, 1881 from *V. chivi* captured in the Marambaia Island, on the coast of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. The oocysts of *Isoospora juruviarae* Andrade & Berto n. sp. are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 26 by 24 μm . Micropyle is absent or inconspicuous. Oocyst residuum absent, but polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal with pointed posterior end, measuring on average 17 by \times 11 μm . Stieda and Sub-Stieda bodies are present. Sporocyst residuum is present among the vermiform sporozoites, which have refractile bodies and nucleus. This morphology was different from the other *Isoospora* spp. recorded in the same family, superfamily and parvorder as the host. Molecular identification was targeted by the amplification and sequencing of two different loci of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene and one locus of the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene. Phylogenetic analyses were not very efficient in forming monophyletic groups associated with host taxon, zoogeographical region or taxonomic character; however, they confirmed the identification as a new species through comparison with sequences from *Isoospora* spp. of wild passerines. Finally, based on the morphological and molecular analyses of the oocysts recovered from the chivi vireo *V. chivi* in the current work, *I. juruviarae* is considered new to science, being the second species recorded in the host family Vireonidae and the first to have a supplementation by molecular identification.

1. Introduction

Tropical environments have a great diversity of life, observed in its most varied forms, from animals and plants to microorganisms. Despite this known biodiversity, parasitic species such as coccidian Protozoa are underestimated, mainly from wild animals [1]. Berto et al. [2] indicate this scenario by reporting that only 2% of New World passerine birds diversity has been examined for coccidian parasites.

Marambaia Island, located in Sepetiba Bay, on the coast of Rio de Janeiro, is an environment where several types of biomes converge, such as Mangroves, Restinga and Atlantic Rainforest [3]. This is also the type locality of more than a dozen coccidian species, described from birds of

different species and families [2].

The chivi vireo *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) is a passerine bird distributed throughout Brazil that inhabits the intermediate layer of forests, cyclamen forests, coastal sandbanks and urban forests, known for its incessant song, mainly in spring and summer [4,5]. *Vireo chivi* is derived from the former subspecies *Vireo olivaceus chivi* (Vieillot, 1817), which was recently elevated to the taxonomic category of species [6].

In this context, the present study provides a description and molecular identification of a new species of *Isoospora* Schneider, 1881 from chivi vireos *V. chivi* captured in the Marambaia Island, on the coast of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102806>

Received 8 July 2023; Received in revised form 4 September 2023; Accepted 5 September 2023

Available online 7 September 2023

1383-5769/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Six expeditions, between 2019 and 2022, were conducted in three areas with different biomes on the Marambaia Island, on the coast of the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. Two of these expeditions were in a Mangrove area (23°03'54"S, 43°59'21"W), two in an Atlantic Rainforest area (23°03'39"S, 43°58'47"W) and two in a Restinga area (23°03'47"S, 43°59'18"W). Mist nets were used for the capture of the birds. Sixteen specimens of *V. chivi* were captured in all three biomes of the Marambaia Island. The captured birds were specifically identified [5,7], photographed and banded with numbered metal rings provided by the Brazilian bird-ringing agency (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE) [8]. 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 [9].

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 7 days. 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 [10] and Berto et al. [11]. Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera Eurekam 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 are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

2.3. Molecular analyses

One hundred oocysts of the same morphotype under light microscopy, which were recovered from a single fecal droplet, were isolated, resuspended in 0.9% phosphate buffered saline (PBS) and washed by centrifuging until the supernatant became clear [12]. DNA was extracted from oocysts 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 oocysts. PCR amplification of two different (partially overlapped) *loci* of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene and one *locus* of the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene were targeted (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) (1×), 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 were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

2.4. 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

Table 1
Primers and cycling conditions for PCR amplification of *loci* of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) and 18S small subunit ribosomal RNA (18S) genes.

Gene	Locus	Primer	Primer sequence	Cycling conditions	Reference
<i>cox1</i> (mitochondrial)	COIB1	COIB1 (external; forward)	5' GWTCATTAGTATGGGCACATCA 3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 45 °C for 30 s, 45 °C for 45 s and 72 °C for 30 s and a final extension of 72 °C for 5 min	Dolnik et al. [12]
		COIBr1 (external; reverse)	5' CCAAGAGATAATACRAARTGGAA 3'		
		COIB2 (internal; forward)	5' GGGCACATCATATGATGAC 3'		
		COIBr2 (internal; reverse)	5' ATAGTATGATCATGTARWGCA 3'		
	JAV	JAVf (forward)	5' CTCAAATTTGGITTCAGGTGTTGTT 3'	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	Genovez-Oliveira et al. [18]
18S (nuclear)	1NF	JAVr (reverse)	5' TACACCAGTAGTACCTCCAAGGG 3'	35 cycles of 94 °C for 30 s, 63 °C for 30 s and 72 °C for 50 s and a final extension of 72 °C for 5 min	Genovez-Oliveira et al. [18]
		1Nr (reverse)	5' CTGGACCTGGTGAAGTTTCCC 3'		

Table 2
Comparative morphology of *Isospora* spp. recorded from Parvorder Corvida in New World.

Coccidian species	Host species (Superfamily: Family)	Reference	Oocysts							Sporocysts						
			Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall (µm)	Micropyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium
<i>Isospora brachyrhynchi</i> Wobester & Cawthorn, 1985	<i>Corvus brachyrhynchos</i> Brehm, 1822 (Corvoidea: Corvidae)	Wobester & Cawthorn [26]	subspheroidal	15–25 (20.4)	14–23 (18.9)	1.0–1.3 (1.1)	smooth, ~1.0	absent	present	elongate	14–20 (16.2)	8–13 (10.6)	1.4–2.0 (1.6)	present	–	scattered
<i>Isospora cyanocoracis</i> Upton, Current & Clubb, 1985	<i>Cyanocorax chrysops</i> Vieillot, 1818 (Corvoidea: Corvidae)	Upton et al. [27]	subspheroidal	25–30 (28.7)	24–29 (26.8)	1.0–1.1 (1.1)	smooth, ~2.0	absent	present, 1 or 2	ovoidal	17–21 (19.3)	10–12 (11.4)	1.6–1.8 (1.7)	prominent	homogeneous	clustered
<i>Isospora calocitta</i> Upton, Langen & Wright, 1995	<i>Cyanocorax formosus</i> (Swainson, 1827) (Corvoidea: Corvidae)	Upton et al. [28]	subspheroidal	26–31 (28.8)	25–29 (27.7)	1.0–1.1 (1.0)	lightly pitted, 1.5–2.0	absent	present, 1 to 3	ovoidal	19–22 (20.1)	11–14 (12.6)	1.5–1.7 (1.60)	present	present	scattered
<i>Isospora samoensis</i> Adamczyk, McQuiston & LaPointe, 2004	<i>Foulehaio carunculatus</i> Gmelin, 1788 (Meliphagoidea: Meliphagidae)	Adamczyk et al. [29]	ovoidal	25–32 (28.9)	23–30 (26.1)	1.0–1.3 (1.1)	smooth	absent	present, 1 or 2	ovoidal	16–18 (17.1)	10–11 (10.9)	1.5–1.7 (1.6)	large	retangular	clustered
<i>Isospora pitiguari</i> Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014	<i>Cyclarhis gujanensis</i> Gmelin, 1789 (Corvoidea: Vireonidae)	Lopes et al. [15]	subspheroidal	23–28 (26.8)	23–28 (25.7)	1.0–1.1 (1.0)	smooth, 1.3–1.6 (1.5)	absent	absent	rounded to slightly ovoidal	13–15 (14.4)	10–13 (11.6)	1.2–1.3 (1.2)	flattened	rounded	scattered
<i>Isospora juruvivarae</i> Andrade & Berto n. sp.	<i>Vireo chivi</i> (Vieillot, 1817) (Corvoidea: Vireonidae)	current study	subspheroidal to ovoidal,	23–29 (26.0)	23–26 (24.3)	1.0–1.2 (1.09)	smooth, 1.0–2.0 (1.4)	inconspicuous	present, 1 or 2	ellipsoidal with pointed posterior end	14–19 (16.8)	9–12 (10.6)	1.4–1.9 (1.63)	prominent, knob-like	compartmentalized, trapezoidal	clustered and/or scattered

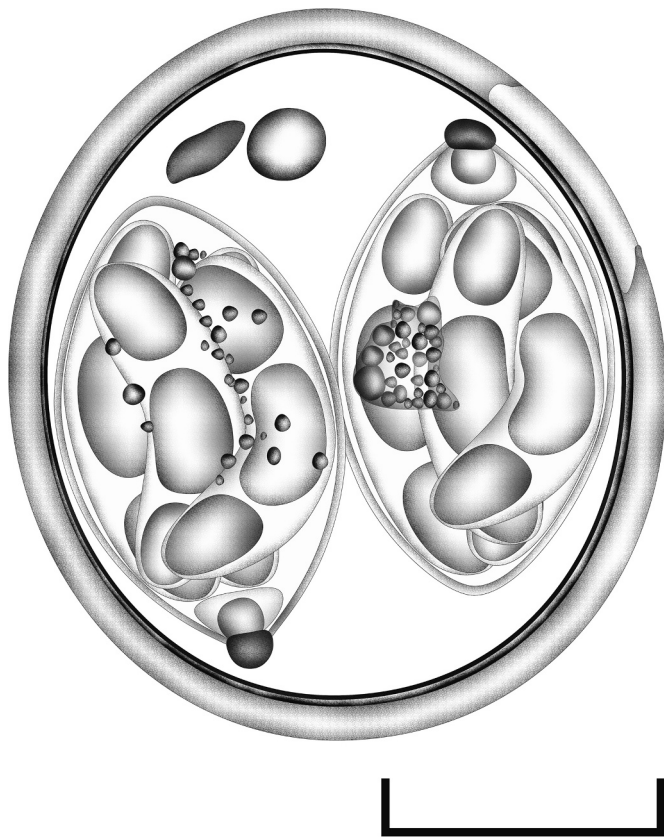


Fig. 1. Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isospora juruviarae* from chivi vireos *V. chivi* in Southeastern Brazil. Scale-bar: 10 μ m.

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 [13] and using Maximum likelihood method in the MEGA [14]. 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 1000,000 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 1000 replicates. The resultant phylogenetic trees were visualized in the MrBayes and MEGA and exported in FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

3. Results

3.1. Prevalence and description

Nine of 16 *V. chivi* captured in the Marambaia Island were positive for coccidian oocysts. The two specimens captured in the Atlantic Rainforest area were positive; One of the two *V. chivi* was positive in the Mangrove area; and six of the twelve *V. chivi* captured in the Restinga area were positive. The observed coccidian oocysts were classified in the genus *Isospora*; however, they did not share the same taxonomic characters with any *Isospora* sp. previously recorded from passerines of the same genus or family as the host (Table 2). This material is described below.

Isospora juruviarae Andrade & Berto n. sp. (Figs. 1, 2).

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 ($n = 44$) subspheroidal to ovoidal, 23–29 \times 23–26 (26.0 \times 24.3); L/W ratio 1.0–1.2 (1.09). Wall bi-layered, 1.0–2.0 (1.4) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle is not generally observed, but appears inconspicuous and irregular in some oocysts. Oocyst residuum absent, but 1–2 polar granules subspheroidal, ellipsoidal or asymmetrical are present. Sporocyst ($n = 44$) ellipsoidal with pointed posterior end, 14–19 \times 9–12 (16.8 \times 10.6); L/W ratio 1.4–1.9 (1.63). Stieda body present, prominent, knob-like, 0.8–1.2 high \times 1.6–1.8 wide (1.0 \times 1.7). Sub-Stieda body present, subtly compartmentalized (barely discernible in some sporocysts), in which the central, denser compartment, subspheroidal to rectangular in shape, is directly connected to the Stieda body, and the second compartment, less dense, completes the trapezoid shape of the sub-Stieda body, 1.1–1.9 high \times 2.2–3.0 wide (1.6 \times 2.5). Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, consisting of numerous granules clustered and/or scattered among the sporozoites. Sporozoites vermiform, with posterior and anterior refractile bodies and a central nucleus.

3.2. Diagnosis

Isospora juruviarae is the second coccidian species recorded from Vireonidae. The typical taxonomic characters in the oocysts of *I. juruviarae* are the Stieda and sub-Stieda bodies and sporocyst shape. Of the more reasonably related coccidian species, *I. juruviarae* is the only one to have a prominent knob-like Stieda body, compartmentalized sub-Stieda body and sporocysts with a pointed posterior end (Table 2). The inconspicuous presence of micropyle observed in some oocysts of *I. juruviarae* also typifies the species, distinguishing it from the others (Table 2). The coccidian species most closely related to *I. juruviarae* should be *Isospora pitiguari* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014, which was described from a host of the same family and type-locality [15]. *Isospora pitiguari* can be easily distinguished from *I. juruviarae* by the absence of polar granules, rounded sporocysts and different shapes of Stieda and sub-Stieda bodies.

3.3. Taxonomic summary

Type host: *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) (Aves: Passeriformes: Passeri: Corvida: Corvoidea: Vireonidae), chivi vireo.

Type locality: Marambaia Island (23°03'S, 43°59'W), coast of the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oocysts in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution [16] are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/1abicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under the repository number P-133/2023. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COIBF1, JAV and 1NF loci (Table 1) showed clear bands around ~250 bp, ~650 bp and ~444 bp, respectively. Representative sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers: OR243295 (COIBF1); OR243296 (JAV); and OR231933 (1NF).

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:71EED286-C9E3-4F61-ACF9-01C90C6DE6E6. The LSID for the new name *Isospora juruviarae* Andrade

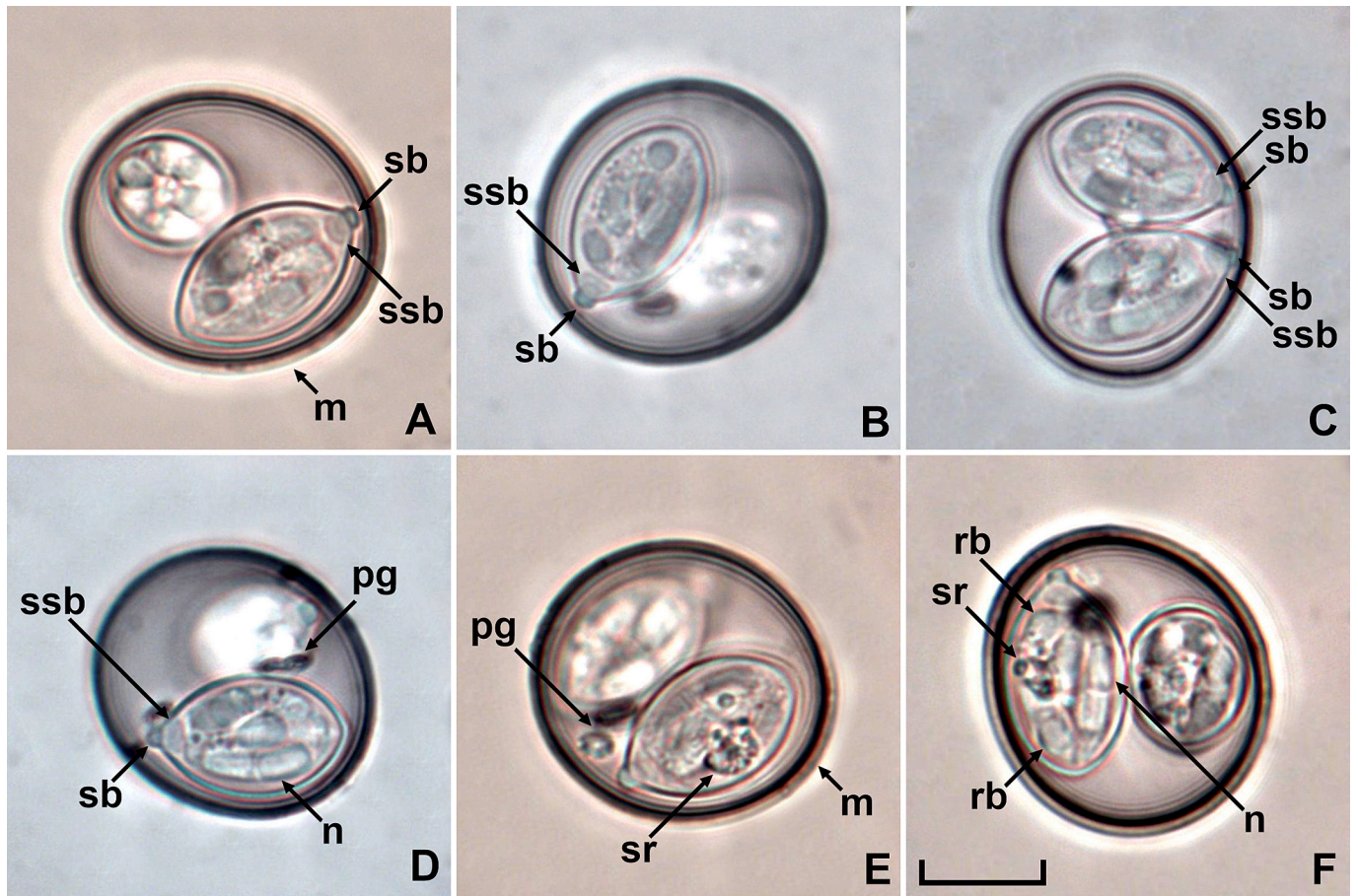


Fig. 2. Photomicrographs of *Isospora juruviarae* recovered from chivi vireos *V. chivi* in Southeastern Brazil. Note the micropyle (m), nucleus (n), polar granules (pg), refractile body (rb), sporocyst residuum (sr), Stieda body (sb) and sub-stieda (ssb) bodies. Scale-bar: 10 μ m.

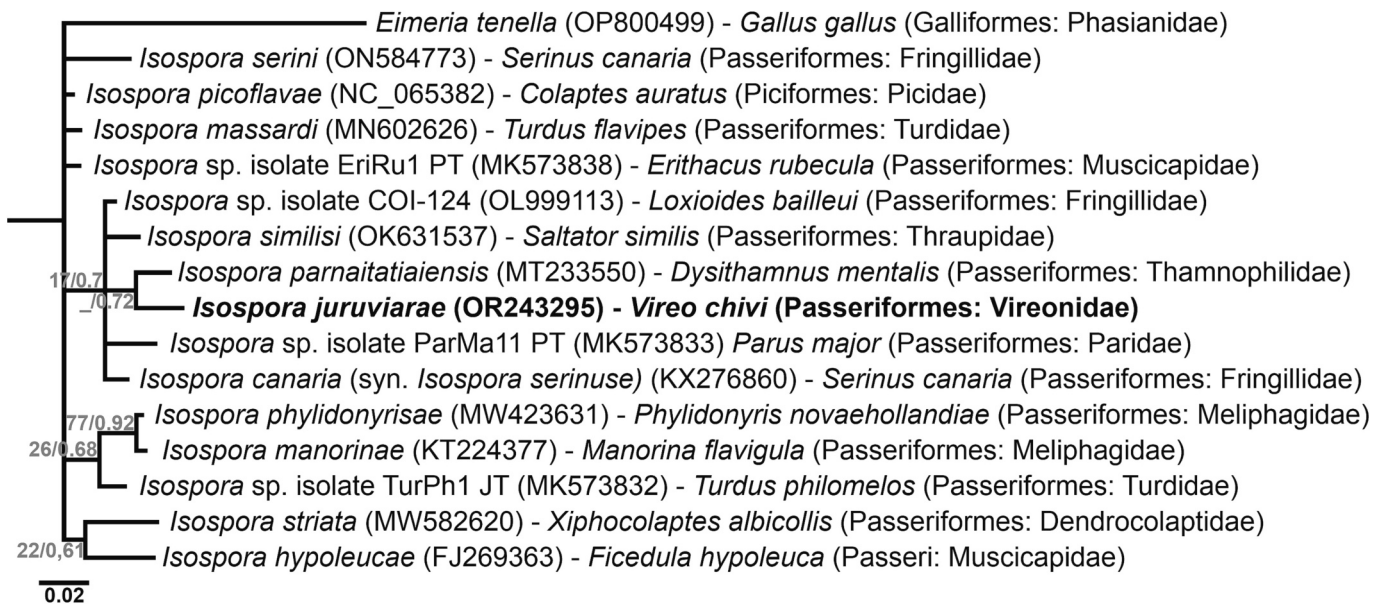


Fig. 3. Phylogenetic relationship of *Isospora juruviarae* from chivi vireos *V. chivi* inferred by Bayesian analysis for a locus (COIBF1) within *cox1* gene of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from Maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed.

& Berto n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:83DA2944-B329-4819-B212-9A253705291D.

Site of infection: Unknown, oocysts were recovered from feces.

Prevalence: 56% (9/16) in total; 100% (2/2) in Atlantic Rainforest area; 50% (1/2) in Mangrove area; and 50% (6/12) in Restinga area.

Etymology: The specific name is derived from the common local name for the host, which is 'juruviara'.

3.4. Molecular analyses

Molecular analyses of the oocysts morphologically identified as *I. juruviarae* recovered from *V. chivi* revealed the presence of eimeriid sequences differing from other coccidians deposited in the GenBank database.

At COIBF1 locus, *I. juruviarae* had the highest similarities of 97.3% with sequences deposited for an *Isoospora* sp. recovered from the palila *Loxioides bailleui* (Oustalet, 1877), which is a critically endangered finch from the Hawaiian Islands [17], and 96.8% with sequences deposited for *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 from yellow-legged thrushes *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818) and *Isoospora parnaitaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 from plain antvireos *Dysithamnus mentalis* (Temminck, 1823), both from Parque Nacional do Itatiaia in southeastern Brazil [18,19].

At JAV locus, *I. juruviarae* had the highest similarities of 96.8% with sequences deposited for *Isoospora* spp. recovered from palila *L. bailleui* and black-naped orioles *Oriolus chinensis* Linnaeus, 1766, which are geographically distributed across countries in East Asia [17], and 96.7% with a sequence deposited for *Isoospora manorinae* Yang, Brice, Jian & Ryan, 2016 from the yellow-throated miner *Manorina flavigula* (Gould, 1840) of Australia [20].

At 1NF locus, *I. juruviarae* had the highest similarity of 99.0% with sequences deposited for *Isoospora canaria* Box, 1975 (syn. *Isoospora serinuse* Yang, Brice, Elliot & Ryan, 2015) from island canaries *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758) [21] and an *Isoospora* sp. recovered from American robins *Turdus migratorius* Linnaeus, 1766 in Canada (unpublished data; GenBank accession number: MW649140).

3.5. Phylogenetic analyses

Phylogenetic analysis based on the COIBF1, JAV and 1NF loci included sequences from coccidians available in GenBank (Figs. 3-5). *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) was used as the outgroup in the phylogenies of the mitochondrial loci (Figs. 3, 4) and *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) was used as the outgroup in the phylogenetic analysis of the 1NF locus of the 18S gene (Fig. 5).

In the cladogram referring to the phylogenetic analysis of the COIBF1 locus (Fig. 3), *I. juruviarae* sat in a clade with *Isoospora* spp. of passerines from different families and suborders, in the Neotropical region, but also from other distant zoogeographical regions. In the cladogram of the JAV locus (Fig. 4), *I. juruviarae* sat in monophyly with an *Isoospora* sp. from black-naped orioles of East Asia [17], within a larger clade with *Isoospora* spp. from different zoogeographical regions of the world. The only two *Isoospora* spp. from the Neotropical region of this phylogenetic analysis, *I. massardi* and *Isoospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010, sat in separate clades [18,22]. Finally, in the phylogenetic analysis of the 1NF locus (Fig. 5), *I. juruviarae* sat in a large clade with *Isoospora* spp. of Passeriformes and, more distantly, of Eimeria spp. of Galliformes and Psittaciformes. These relationships were reasonably supported in all analyses.

4. Discussion

In the current work, the chivi vireos captured in the different biomes of Mangrove, Restinga and Atlantic Rainforest in Ilha da Marambaia were positive for *I. juruviarae* with different prevalences; however, it is not possible to make ecological inferences due to the low number of captured chivi vireos, mainly in the Atlantic Rainforest and Mangrove areas. On the other hand, it is clear that these biomes are not ecological barriers to the distribution and/or dispersion of *I. juruviarae* on Marambaia Island. In this sense, when observing the wide geographic distribution of *V. chivi* throughout South America, added to other *Vireo* spp. which are also distributed in Central and North America, it can be hypothesized that *I. juruviarae* has the potential to disperse and be distributed throughout the New World, where *Vireo* spp. are geographically distributed [23,24]. In addition, the congeneric species of red-eyed vireos *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766), white-eyed vireos *Vireo*

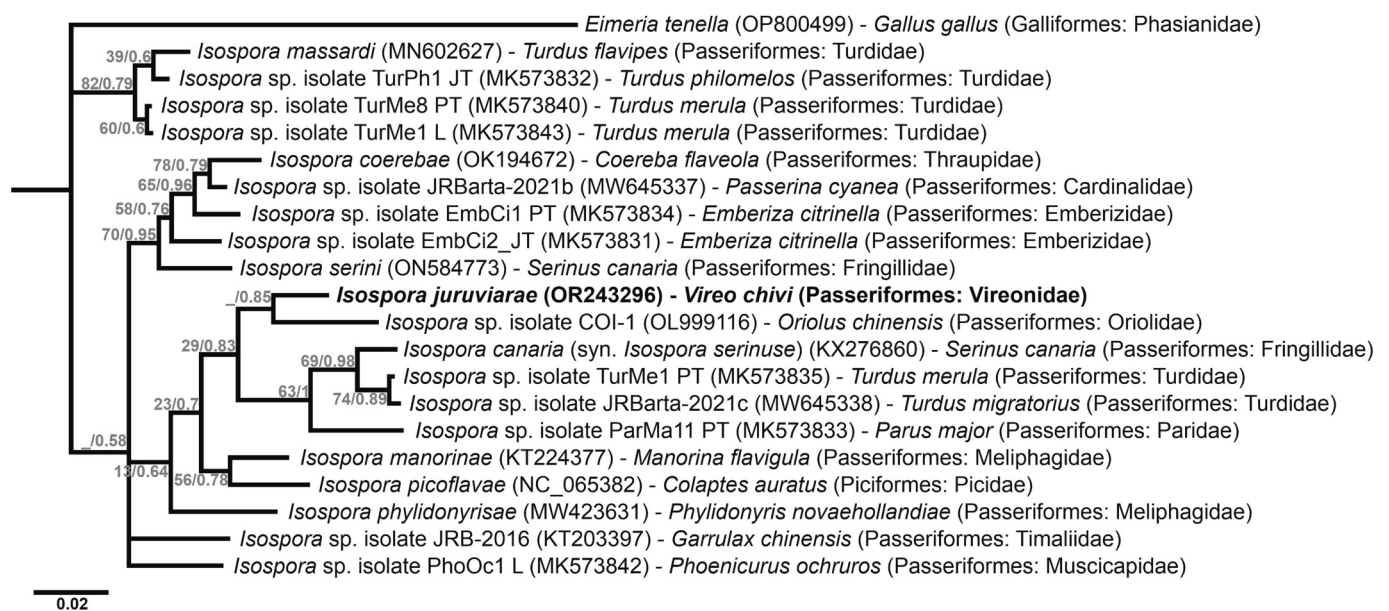


Fig. 4. Phylogenetic relationship of *Isoospora juruviarae* from chivi vireos *V. chivi* inferred by Bayesian analysis for a locus (JAV) within *cox1* gene of the mitochondrial genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from Maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed.

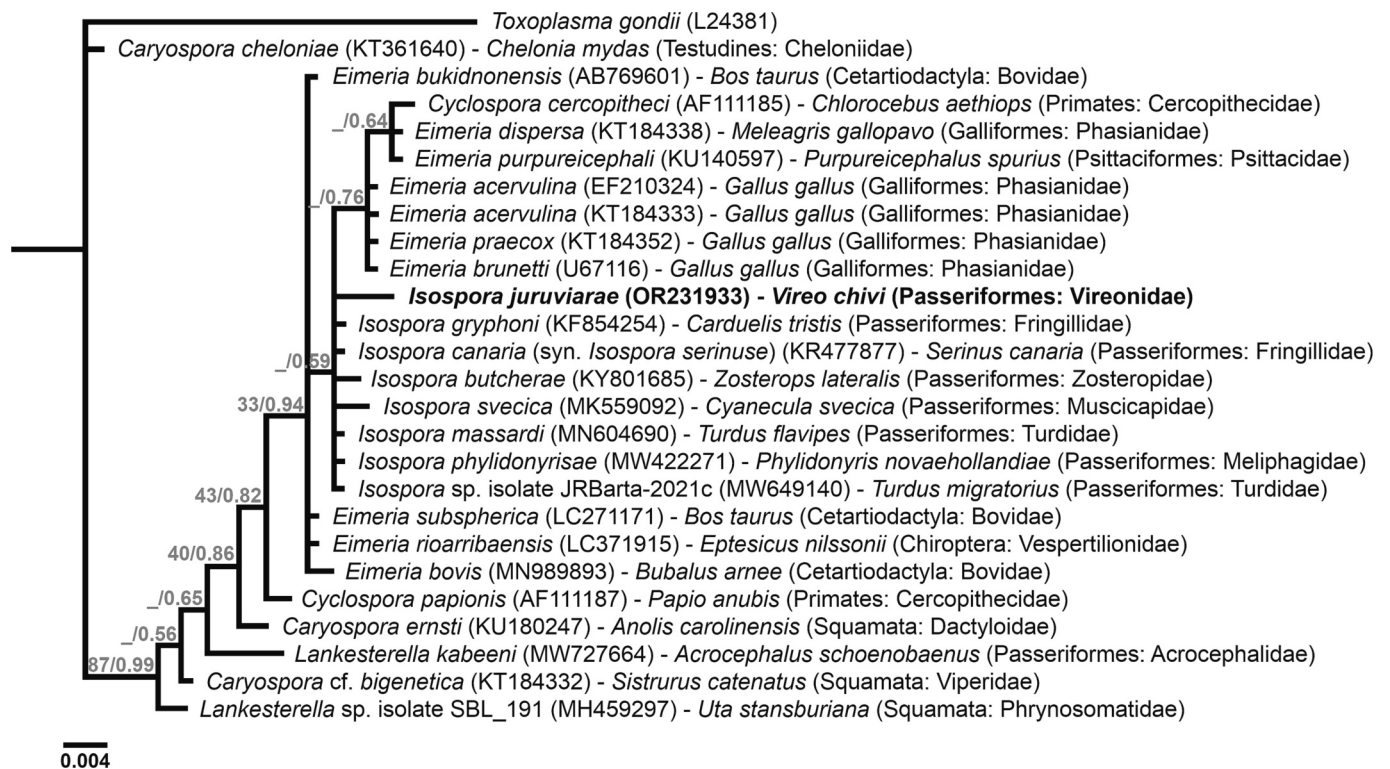


Fig. 5. Phylogenetic relationship of *Isospora juruviae* from chivi vireos *V. chivi* inferred by Bayesian analysis for a locus (1NF) within 18S gene of the nuclear genome. Numbers at the nodes show bootstrap values derived from Maximum likelihood analysis/posterior probabilities under the Bayesian Inference analysis. Only bootstrap supports and posterior probabilities higher than 50% or 0.50, respectively, are displayed.

griseus (Boddaert, 1783), black-whiskered vireos *Vireo altiloquus* (Vieillot, 1808), yellow-throated vireos *Vireo flavifrons* Vieillot, 1808 and Philadelphia vireos *Vireo philadelphicus* (Cassin, 1851), which are vagrant species in Asia, Europe, Africa and Oceania, would have the possibility of worldwide distribution/dispersion of *Isospora* spp., even if in a very low probability [23,24]. It is also worth mentioning that, considering the specificity of *Isospora* spp. at the host family level, there are the white-bellied erpornis *Erpornis zantholeuca* (Blyth, 1844) and shrike-babblers *Pteruthius* spp., which are of the family Vireonidae and are native and distributed in Asia [23,24].

The only *Isospora* sp. recorded in the host family Vireonidae is *I. pitiguari* (Table 1), which has the same type locality as *I. juruviae* [15]. In this sense, *I. juruviae* should be evaluated as close to *I. pitiguari*, at least ecologically, even if their hosts are not congeneric. However, the oocysts of *I. juruviae* are morphologically distinct from *I. pitiguari*, in several taxonomic characters (Table 2), supporting the identification as a new species. Additionally, aiming to expand the study of comparative morphology of *I. juruviae* with other coccidian species, in addition to *I. pitiguari*, *Isospora* spp. recorded in host families phylogenetically close to the Vireonidae were compared to morphologically prove the new species (Table 2). In this sense, *Isospora* spp. from other families (Corvidae and Meliphagidae) and superfamilies (Corvoidea and Meliphagoidea) within Parvorder Corvida were added for morphological comparison in Table 2 [23,25].

Molecular studies of the loci sequenced in the current work were not conclusive in the phylogenetic analyses (Figs. 3-5) because they do not form monophyletic groups with *Isospora* spp. related to some host taxon, zoogeographical region or taxonomic character. These results would be expected in an understanding of coevolution between coccidia and their hosts in their respective zoogeographic regions [24]. Possibly the still low number of deposits of *Isospora* spp. in Genbank, associated with the different mitochondrial and nuclear loci sequenced for each coccidian species in the different studies, are hindering more conclusive phylogenetic analyses. Only in the analysis of the locus 1NF of the nuclear

gene 18S, which added other coccidian genera, a reasonable grouping in monophyletic groups associated with host taxa was observed (Fig. 5). The reason for including species from higher taxa, including the most distant outgroup, in the phylogenetic analysis of the locus 1NF lies in the fact that the 18S gene is known to be a more conserved gene than the mitochondrial genes [18,21,22], as can be verified by the high similarity ~99% with *Isospora* spp. and *Eimeria* spp., which are biologically and morphologically quite different. In this sense, these results reinforce that the sequencing of the loci of 18S are more suitable for the phylogenetic analysis of higher taxa, and less suitable for species delimitation.

Despite the insufficient effectiveness of the phylogenetic analysis of *Isospora* spp. from passerine birds, it is important to emphasize that the sequences have been highly efficient in the delimitation and identification of coccidian species, mainly at the mitochondrial loci. The recent study by Berto et al. [21] can be highlighted in this sense, which identified molecularly *I. canaria* and *Isospora serini* (Aragão, 1933) Box, 1975 from sequences reported as 'extraintestinal *Isospora*' and specific misidentifications, which became junior synonyms. At the same time, Hafeez et al. [30] differentiated two morphologically equivalent *Isospora* spp. by a genetic divergence of 1.7% at the *cox1* gene and 0.6% at the 18S gene. From other eimeriid genera, *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909 and *Eimeria necatrix* Johnson, 1930 can be highlighted, which are 99.2% identical throughout the mitochondrial genome [31], although they are morphologically and biologically distinct. Thus, the differences by nucleotide substitution, in >3% for the mitochondrial loci and 1% for the locus of the gene 18S, prove the identification of *I. juruviae* as a new species in a molecular approach, at least in a comparison with the coccidian species deposited in GenBank.

5. Conclusion

Finally, based on the morphological and molecular data obtained from the isosporan oocysts recovered from chivi vireos from three different biomes of Marambaia Island, which were compared with the

closest *Isoospora* spp. and recorded in the same Parvorder (Corvida) as the host, *I. juruviarae* is considered new to Science, being the second species recorded in the host family Vireonidae and the first to have a supplementation by molecular identification.

Ethics statement

Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (license 70,132) and CEUA/UNIGRANRIO (protocol 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.

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 and CNO-F 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).

Author contributions

The study was designed by SVC, VML and BPB. Field work was performed by LASA, CNO-F, MSO and BPB. Laboratory procedures for maintenance, recovery, measurements, photomicrographs and isolation of oocysts were performed by LASA and CNO-F. DNA extraction, amplification and sequencing were performed by MSO and VML. New sequences were deposited in GenBank by VML. Phylogenetic analyses, figure editing and line drawings were performed by BPB. The manuscript was written by LASA and BPB and subsequently revised by all other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments

We are thankful to staff at the Centro de Avaliação da Ilha da Marabá (CADIM) of the Brazilian Navy, and to the coordinator of the agreement between the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) and CADIM, Prof. Dr. Marcelo da Costa Souza (Departamento de Botânica - UFRRJ), that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

References

- [1] D.W. Duszynski, 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 (2021) 001, <https://doi.org/10.14411/fp.2021.001>.
- [2] B.P. Berto, W. Flausino, D. McIntosh, W.L. Teixeira-Filho, C.W.G. Lopes, Coccidia of new world passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae), *Syst. Parasitol.* 80 (2011) 159–204, <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>.
- [3] D.M. Braz, I.H.F. Azevedo, Acanthaceae da Marabá, Estado do Rio de Janeiro, Brazil, *Hoehnea* 43 (2016) 497–516, <https://doi.org/10.1590/2236-8906-12/2016>.
- [4] H. Sick, *Ornitologia Brasileira*, Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.
- [5] D.J.M. Mello, G.J.M. Mello, F. Mallet-Rodrigues, L.M. Lima, *Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação*, Editora Irmãos Mello, Rio de Janeiro, 2020.
- [6] J.F. Pacheco, L.F. Silveira, A. Aleixo, C.E. Agne, G.A. Bencke, G.A. Bravo, G.R. Brito, M. Cohn-Haft, G.N. Maurício, L.N. Naka, F. Olmos, S. Posso, A.C. Lees, L.F. A. Figueiredo, E. Carrano, R.C. Guedes, E. Cesari, I. Franz, F. Schunck, V. Q. Piacentini, Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian ornithological records committee – second edition, *Ornithol. Res.* 29 (2021) 94–105, <https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>.
- [7] R.S. Ridgely, J.A. Gwynne, G. Tudor, M. Argel, *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*, Horizonte, São Paulo, 2015.
- [8] A.E.B.A. Sousa, P.P. Serafini, *Manual de Anilhamento de Aves Silvestres*, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, Brasília, 2020.
- [9] O.V. Dolnik, 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 (2006) 155–160, <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>.
- [10] R.S. Duszynski, P.G. Wilber, A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae, *J. Parasitol.* 83 (1997) 333–336, <https://doi.org/10.2307/3284470>.
- [11] B.P. Berto, D. McIntosh, C.W.G. Lopes, Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida), *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23 (2014) 1–15, <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>.
- [12] O.V. Dolnik, V. Palinauskas, S. Bensch, Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence, *J. Parasitol.* 95 (2009) 169–174, <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>.
- [13] F. Ronquist, M. Teslenko, P. Van Der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck, MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space, *Syst. Biol.* 61 (2012) 539–542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- [14] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.* 35 (2018) 1547–1549, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- [15] B.B. Lopes, B.P. Berto, H.R. Luz, G.D.S. Galvão, I. Ferreira, C.W.G. Lopes, *Isoospora pitiguari* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae) *Cyclarhis guianensis* Gmelin, 1789, *Zootaxa* 3760 (2014) 96–100, <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3760.1.7>.
- [16] R.B. Williams, P. Thebo, R.N. Marshall, J.A. Marshall, Coccidian oocysts as type specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA, *Syst. Parasitol.* 76 (2010) 69–76, <https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>.
- [17] S.V. Kubiski, C. Witte, J.A. Burchell, D. Conradson, A. Zmuda, A.R. Barbon, J. G. Vilches-Moure, S.A. Felt, B.A. Rideout, Mitochondrial gene diversity and host specificity of *Isoospora* in passerine birds, *Front. Vet. Sci.* 9 (2022), 847030, <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.847030>.
- [18] J.L. Genovez-Oliveira, M.S. Oliveira, S. Thode-Filho, S.V. Cardozo, A.A. Oliveira, V.M. Lima, I. Ferreira, B.P. Berto, 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 (2020) 102040, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102040>.
- [19] L.M. Silva-Carvalho, J.L. Genovez-Oliveira, M.S. Oliveira, A.A. Oliveira, V.M. Lima, I. Ferreira, B.P. Berto, Polymorphism and genetic diversity of *Isoospora parnaitaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil, *Syst. Parasitol.* 97 (2020) 847–855, <https://doi.org/10.1007/s11230-020-09940-6>.
- [20] R. Yang, B. Brice, F. Jian, U. Ryan, Morphological and molecular characterization of *Isoospora manorinae* n. sp. in a yellow-throated miner (*Manorina flavigula wayensis*) (Gould, 1840), *Exp. Parasitol.* 163 (2016) 16–23, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.013>.
- [21] B.P. Berto, E.L. Machado, C.M.D.S. Hossotani, B.M.S. Beretta, D.R.R. Silva, A. A. Nakamura, M.V. Meireles, Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): worldwide distribution, morphological and molecular characterization, reevaluations and establishment of junior synonyms, *Syst. Parasitol.* 100 (2023) 245–259, <https://doi.org/10.1007/s11230-023-10084-6>.
- [22] C.N. Ortúzar-Ferreira, L.A.S. Andrade, J.L. Genovez-Oliveira, M.S. Oliveira, E. R. Mello, S.V. Cardozo, A.A. Oliveira, V.M. Lima, I. Ferreira, B.P. Berto, Molecular identification of *Isoospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira amp; Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil, *Zootaxa* 5168 (2022) 83–91, <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5168.1.7>.
- [23] BirdLife International, The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>, 2023 (accessed 27.06.23).
- [24] B.P. Berto, C.W.G. Lopes, Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction, *J. Parasitol.* 106 (2020) 707–713, <https://doi.org/10.1645/19-148>.
- [25] S.J. Brands, *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. <http://taxonomicon.taxonomy.nl>, 2023 (accessed 27.06.23).
- [26] G.A. Wobester, R.J. Cawthorn, Exogenous and endogenous stages of *Isoospora brachyrhynchii* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the American crow *Corvus*

- brachyrhynchus* Brehm, Can. J. Zool. 63 (1985) 2639–2645, <https://doi.org/10.1139/z85-394>.
- [27] S.J. Upton, W. Current, S. Clubb, Two new species of *Isoospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from passeriform birds of South America, Syst. Parasitol. 7 (1985) 227–229, <https://doi.org/10.1007/BF00011453>.
- [28] S.J. Upton, T.A. Langen, T.F. Wright, A new species of *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-throated magpie jay *Calocitta formosa* (Passeriformes: Corvidae) from Costa Rica, Syst. Parasitol. 31 (1995) 195–199, <https://doi.org/10.1007/BF00009117>.
- [29] K.J. Adamczyk, T.E. McQuiston, D. LaPointe, A new coccidian parasite, *Isoospora samoensis*, from the wattled honeyeater (*Foulehaio carunculata*) from American Samoa, Acta Protozool. 43 (2004) 179–181.
- [30] M.A. Hafeez, I. Stasiak, P. Delnatte, S. El-Sherry, D.A. Smith, J.R. Barta, Description of two new *Isoospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprolornis superbus* (Aves: Sturnidae), Parasitol. Res. 113 (2014) 3287–3297, <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3992-8>.
- [31] X. Zhou, L. Wang, P. Zhu, Z. Yang, Z. Wang, Y. Chen, X. Gu, R. He, J. Xu, B. Jing, G. Yang, S. Chen, S. Wu, Y. Xie, Comprehensive molecular characterization of complete mitogenome assemblies of 33 *Eimeria* isolates infecting domestic chickens, Parasit. Vectors 16 (2023) 109, <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05712-5>.