

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIA
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL**

**COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO-DA-TERRA, *Sicalis flaveola*, DE
VIDA SILVESTRE E CATIVOS**

TAYNARA KEROLAYNE SANTOS ELIZEU

Campos dos Goytacazes

2022

**COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO DA TERRA, *Sicalis flaveola*, DE
VIDA SILVESTRE E CATIVOS**

TAYNARA KEROLAYNE SANTOS ELIZEU

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

ORIENTADOR: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

COORIENTADORA: Samira Salim Mello Gallo

Campos dos Goytacazes

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

E43

Elizeu, Taynara Kerolayne Santos.

Coccídios parasitas de canário da terra, *Sicalis flaveola*, de vida silvestre e criados em cativeiros / Taynara Kerolayne Santos Elizeu. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

140 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientador: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Coorientadora: Samira Salim Mello Gallo.

1. Passeriformes. 2. *Isospora*. 3. *Eimeria*. 4. *Cryptosporidium*. 5. oocistos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

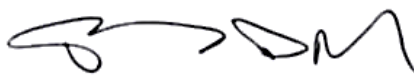
TAYNARA KEROLAYNE SANTOS ELIZEU

**COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO-DA-TERRA, *Sicalis flaveola*, DE
VIDA SILVESTRE E CATIVOS**

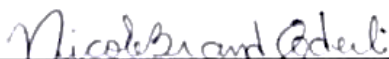
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

Aprovada em 07 de março de 2022.

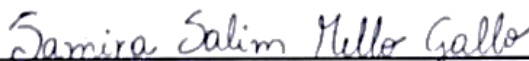
BANCA EXAMINADORA



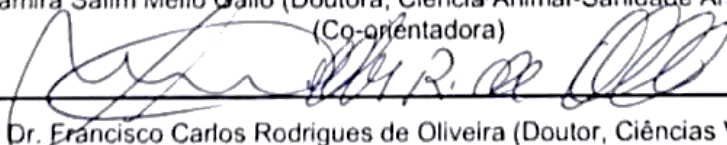
Prof. Dr. Bruno Pereira Berto (Doutor, Parasitologia-Biologia Animal) – UFRRJ



Prof. Dr. Nicole Brand Ederli (Doutora, Ciência Animal-Sanidade Animal) – UFF



Dr. Samira Salim Mello Gallo (Doutora, Ciência Animal-Sanidade Animal) – UENF
(Co-orientadora)



Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor, Ciências Veterinárias-Parasitologia Veterinária) – UENF
(Orientador)

*Não importa o que seja; o importante é
saber que sempre há uma forma de superar
e reaprender: recomeçar tudo de uma forma
diferente! Afinal, tudo se renova!*

Taynara Elizeu

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e coragem para chegar até aqui, pois sem ele nada eu seria.

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais Rosa Maria Elizeu e Nilson Sérgio Santos Elizeu, minhas avós, meu namorado e minha afilhada, pelo apoio e incentivo. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, se mil vidas eu viver, mil vidas quero estar ao lado de vocês. Em memória ao meu tio que faleceu nessa etapa da minha vida, pessoa tão importante, que torcia por mim e me incentivava.

Aos meus amigos, obrigada por se empenharem nessa caminhada, seguindo junto comigo em todos os momentos.

Agradeço também ao meu orientador, Dr. Francisco Carlos de Oliveira, pelo incentivo, paciência, empenho, e por acreditar, desde o início, que este projeto daria certo.

A minha coorientadora, mais que especial, Dra. Samira Salim Mello Gallo, por toda ajuda prestada, sem você não teria chegado até aqui, obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos prestados e, também, pela execução dos desenhos.

À professora Dra. Nicole Brand Ederli, por todas as dicas prestadas para execução do projeto.

Aos pássaros, todo meu respeito e admiração, sem eles não seria possível esta pesquisa.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por ter aberto as portas para a continuação do meu ensino.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio da bolsa durante todo meu mestrado.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para minha formação.

Grata por todos que torceram por mim e acreditaram que eu seria capaz!

RESUMO

ELIZEU, T.K.S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2022. Coccídios parasitas de canário da terra, *Sicalis flaveola*, de vida silvestre e criados em cativeiro. Co-orientadora: Dra. Samira Salim Mello Gallo. Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, uma ave passeriforme, está presente na natureza em praticamente todo território brasileiro, além de ser criada em cativeiro. Espécies de *Isospora* e *Cryptosporidium* são descritas parasitando essas aves cativas. Este trabalho objetivou fazer um levantamento qualitativo e quantitativo das espécies de coccídios parasitas de canários-da-terra, *S. flaveola*, de cativeiro e vida livre e descrever morfologicamente e morfometricamente as espécies encontradas. Para tanto, foram realizadas coletas fecais, em cidades do Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais, de 30 pássaros de vida livre e 30 criados em cativeiro. Tais amostras foram processadas e foi realizada a contagem de Oocistos por Grama de Fezes (OoPG). As amostras positivas foram colocadas para esporular em uma solução de dicromato de potássio 2,5%. Em sete aves cativas de uma loja que comercializa pássaros foi observado microscopicamente pequenos oocistos que, após coloração pela técnica de Ziehl Neelsen, confirmou-se o diagnóstico do gênero *Cryptosporidium*. Através de nested PCR e sequenciamento, a espécie *Cryptosporidium galli* foi encontrada em todas as amostras e, uma das aves, estava com infecção mista sendo, também, detectada a espécie *Cryptosporidium andersoni*. Duas espécies já existentes, *Isospora sicalisi* e *Isospora cetasiensis*, foram identificadas tanto em pássaros de vida livre quanto de cativeiro. Nas aves de vida livre, alguns oocistos dessas duas espécies de *Isospora* possuíam grânulo polar, com prevalência de 2% para ambas as espécies, característica essa ainda não relatada. Espécies novas também foram encontradas nas fezes das aves de vida livre e nomeadas *Isospora bertoi* e *Eimeria flaveola*, com prevalências de 7% e 37%, respectivamente. As aves de vida livre e cativeiro apresentaram prevalência de 9% para *I. sicalisi* e 47% para *I. cetasiensis*. A espécie *I. cetasiensis* apresentou maior prevalência tanto em aves de cativeiro (68%) quanto de vida livre (39%).

Palavras-chave: Passeriformes, *Isospora*, *Eimeria*, *Cryptosporidium*, oocistos.

ABSTRACT

ELIZEU, T.K.S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2022. Coccidia parasitic of saffron finches, *Sicalis flaveola*, from wild life and captive bred. Co-advisor: Dr. Samira Salim Mello Gallo. Advisor: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Saffron finch, *Sicalis flaveola*, a passerine bird, is present in nature in practically all Brazilian territory, in addition to being bred in captivity. *Isospora* and *Cryptosporidium* species are described parasitizing these captive birds. This work aimed to carry out a qualitative and quantitative survey of the species of coccidia parasites of saffron finches, *S. flaveola*, in captivity and free-living, and to describe morphologically and morphometrically the species found. For this purpose, fecal collections were carried out from 30 free-living birds and 30 bred in captivity, in cities in the State of Rio de Janeiro and Minas Gerais. Such samples were processed and the Oocyst count per gram of feces (OoPG) was performed. Positive samples were placed to sporulate in a 2.5% potassium dichromate solution. In seven captive birds from a store that sells birds, small oocysts were observed microscopically, which after staining using the Ziehl Neelsen technique confirmed the diagnosis of the genus *Cryptosporidium*. Through nested PCR and sequencing, the species *Cryptosporidium galli* was found in all samples and one of the birds had a mixed infection and the species *Cryptosporidium andersoni* was also detected. Two existing species, *Isospora sicalisi* and *Isospora cetasiensis*, have been identified in both wild and captive birds. In free-ranging birds, some oocysts of these two species of *Isospora* had polar granules, with a prevalence of 2% for both species, a feature that has not yet been reported. New species were also found in the feces of free-living birds named *Isospora bertoi* and *Eimeria flaveola*, with prevalences of 7% and 37%, respectively. Free-living and captive birds showed a prevalence of 9% for *I. sicalisi* and 47% for *I. cetasiensis*. The species *I. cetasiensis* was more prevalent in both captive (68%) and free-living (39%) birds.

Keywords: Passeriformes, *Isospora*, *Eimeria*, *Cryptosporidium*, oocysts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classificação zoológica do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766).....18
- Figura 2.** Dimorfismo sexual do canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, adultos.....20
- Figura 3.** Distribuição do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766) na América do Sul (A) e Brasil. Em destaque (vermelho) as subespécie de ocorrência no Brasil.....23
- Figura 4.** Morfologia de *Isospora* spp. observados em fezes do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766). Em A *Isospora cetasiensis*, Coelho et al, (2011), em B *Isospora sicalisi*, Coelho et al, (2011), (a) oocisto esporulado com suas respectivas variações de corpos de Stieda e Substieda (b-d). Barra de escala = 10 µm para oocisto e 5 µm para corpos de Stieda e Substieda (COELHO et al., 2011)31
- Figura 5.** Canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, de vida livre capturados em Eugenópolis, estado de Minas Gerais. A- espécime macho e B- espécime Fêmea.47
- Figura 6.** Eletroforese em gel de garose (1%) com os produtos da nested PCR de gene 18S Rrna de oocisto de *Cryptosporidium*. Controle positivo (C+); controle negativo (C-), amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 positivas e Marcador de peso molecular (MM). A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb.53
- Figura 7.** Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora sicalisi*: diâmetro maior (a), diâmetro menos(b) e índice morfométrico59
- Figura 8.** Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora sicalisi*.....60
- Figura 9.** Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*: diâmetro maior (a), diâmetro menos(b) e índice morfométrico.....61
- Figura 10.** Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*.....62
- Figura 11.** Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora bertoi* n. sp.: diâmetro maior (a), diâmetro menos(b) e índice morfométrico.....63

Figura 12. Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de <i>Isospora bertoi</i> n. sp.....	64
Figura 13. Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de <i>Eimeria flaveola</i> : diâmetro maior (a), diâmetro menor(b) e índice morfométrico.....	65
Figura 14. Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de <i>Eimeria flaveola</i>	66
Figura 15. Micrografia ótica de oocistos esporulados de <i>Isospora sicalisi</i> sem grânulo polar (A e B) isolados de fezes de canário-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i> , de cativeiro e vida livre e com grânulo polar (C e D) isolados de fezes de <i>S. flaveola</i> de vida livre. Seta indica grânulo polar. Barra: 10 µm.	67
Figura 16. Micrografia ótica de oocistos esporulados de <i>Isospora cetasiensis</i> sem grânulo polar (A e B) isolados de fezes de canário-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i> , de cativeiro e vida livre e com grânulo polar (C e D) isolados de fezes de <i>S. flaveola</i> de vida livre. Seta indica grânulo polar. Barra: 10 µm.	68

ANEXO I

Figura 1. Fotomicrografias de <i>Isospora bertoi</i> n. sp. Encontrado em canário da terra <i>Sicalis flaveola</i> de vida livre. Escalas: 10 µm.....	98
Figura 2. Desenho esquemático de <i>Isospora bertoi</i> n. sp. Encontrado em canário-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de vida livre. Barra: 10 µm.....	99

ANEXO II

Figura 1. Fotomicrografia de <i>Eimeria flaveola</i> n. sp. encontrado no canário da terra <i>Sicalis flaveola</i> . Em A, esporozoítio (seta); em B, grânulo polar (seta); em C, resíduo do esporocisto (seta), grânulo polar (asterisco) e parede dupla do oocisto (cabeça de seta); em D, corpo de Stieda (seta); em E, resíduos dos esporocistos (setas) e em F, grânulo polar (asterisco). Escalas: 10 µm.	110
Figura 2. Desenho esquemático de <i>Eimeria flaveola</i> n. sp. encontrado no canário da terra <i>Sicalis flaveola</i> . Barra: 10 µm.	111

ANEXO III

Figura 1. Oocistos esporulados de <i>Cryptosporidium galli</i> corados pela técnica de Ziehl Neelsen modificada. Barra: 5 µm.....	125
--	-----

Figura 2. Análise filogenética de *Cryptosporidium* spp. usando método estatístico Neighbor-Joining modelo Kimura-2 parâmetros baseado nas sequencias isoladas do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* desse experimento e outras espécies de *Cryptosporidium*.....126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oocistos por grama Fezes (OOPG) de canários-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i> , de cativo em relação ao dimorfismo sexual.....	48
Tabela 2. Oocistos por grama de fezes (OOPG) de canários-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de vida livre em relação ao dimorfismo sexual.....	50
Tabela 3. Oocistos por grama de fezes (OOPG) de machos e fêmeas de canário-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i>	51
Tabela 4. Frequência de oocistos por grama de fezes (OOPG) em relação a origem de canário-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i>	51
Tabela 5. Frequência de oocisto encontrados em canários-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de cativo e vida livre.....	54
Tabela 6. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de espécies de <i>Isospora</i> isolados em fezes de canário-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de cativo.....	55
Tabela 7. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de espécies de <i>Isospora</i> isolados em fezes de canário-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de vida livre.....	57
Tabela 8. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de <i>Eimeria flaveola</i> n sp. isoladas em fezes de canário-da-terra <i>Sicalis flaveola</i> de vida livre.....	58
ANEXO I	
Tabela 1. Morfologia e morfometria de espécie do gênero <i>Isospora</i> encontradas em canários-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i>	102
ANEXO II	
Tabela 1. Morfologia e morfometria comparativa de <i>Eimeria spp.</i> relatadas de aves passeriformes do Novo Mundo.....	115
Tabela 2. Morfologia e morfometria comparativa de <i>Eimeria spp.</i> relatadas de aves passeriformes do Velho Mundo.....	116

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Dados comparativos da morfologia e morfometria de espécie de <i>Isospora</i> observadas em fezes de canário-da-terra, <i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766), segundo Coelho et al. (2011).....	31
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICOS.....	16
3. JUSTIFICATIVA	17
4. REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1. CANÁRIO-DA-TERRA (<i>Sicalis flaveola</i> , Linnaeus, 1766).....	18
4.1.1. Classificação Científica	18
4.1.2. Comercialização e Conservação	18
4.1.3. Morfologia	19
4.1.4. Reprodução	20
4.1.5. Alimentação	21
4.1.6. Distribuição	22
4.2. AVES SILVESTRE EM CATIVEIRO.....	23
4.3. COCCIDIOSE EM AVES.....	24
4.3.1. Sinais clínicos	25
4.3.2. Epidemiologia	25
4.3.3. Prevenção e profilaxia	26
4.4. COCCIDEOS DE PASSERIFORMES.....	27
4.4.1. Coccidiose em passeriformes	27
4.5. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	29
4.6. <i>Isospora</i> spp.....	30
4.6.1. Posição taxonomica	30
4.6.2. Aspectos Morfológicos e Espécies	30
4.6.3. Ciclo Biológico	32
4.7. <i>Eimeria</i> spp.....	32
4.7.1. Posição taxonomica	33
4.7.2. Aspectos Morfológicos e Espécies	33
4.7.3. Ciclo biológico	34
4.8. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	34
4.8.1. Posição taxonomica	35
4.8.2. <i>Cryptosporidium</i> spp em aves	35

4.8.3. Morfologia de <i>Cryptosporidium</i>	36
4.8.4. Ciclo biológico	37
4.8.5. Diagnóstico parasitológico	37
4.8.6. Manifestações clínicas	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1. AMOSTRAGEM.....	40
5.2. COLETA FECAL.....	40
5.2.1. Pássaros criados em cativeiro	40
5.2.2. Passáros de vida livre	41
5.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	41
5.3.1. Contagem de Oocistos por Grama de Fezes (OoPG)	41
5.3.2. Esporulação	42
5.3.3. Morfologia e Morfometria dos Oocistos	43
5.3.4. Contagem Qualitativa dos Oocistos	43
5.3.5. Análise molecular	44
5.3.5.1. Extração do DNA.....	44
5.3.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	45
5.3.5.3. Eletroforese em gel de agarose.....	45
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6. RESULTADOS	47
6.1. OOCISTOS POR GRAMA DE FEZES.....	48
6.1.2. Aves de cativeiro	48
6.1.3. Aves de Vida Livre	48
6.1.4. Diferença relacionada ao sexo	48
6.1.5. Diferença em relação a origem das aves	51
6.2. FREQUÊNCIA.....	51
6.2.1. <i>Isospora sicalisi</i>	52
6.2.2. <i>Isospora cetasiensis</i>	52
6.2.3. <i>Isospora bertoi</i> (Descrição no anexo I)	52
6.2.4. <i>Eimeria flaveola</i> (Descrição no anexo II)	52
6.2.5. <i>Cryptosporidium spp.</i> (Descrição no anexo III)	52
6.3. MORFOMETRIA.....	55
6.3.1. <i>Sicalis flaveola</i> de cativeiro	55
6.3.2. <i>Sicalis flaveola</i> de Vida livre	55

6.3.3. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de <i>Isospora sicalisi</i>	56
6.3.4. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de <i>Isospora sicalisi</i>	56
6.3.5. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de <i>Isospora cetasiensis</i>	60
6.3.6. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de <i>Isospora cetasiensis</i>	60
6.3.7. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de <i>Isospora sp.</i>	62
6.3.8. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de <i>Isospora ibertoi</i>	64
6.3.9. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de <i>Eimeria flaveola n. sp.</i>	64
6.3.10. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de <i>Eimeria flaveola n. sp.</i>	66
6.4 MORFOLOGIA	66
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÃO	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I	94
ANEXO II	107
ANEXO III	120
ANEXO IV	136

1. INTRODUÇÃO

Sicalis flaveola, popularmente conhecido como canário-da-terra, possui um lindo canto melodioso, pássaro que representa um símbolo brasileiro histórico, retratando a força dos sertanejos, visto como amigo e resistente. São pássaros granívoros, que ocasionalmente se alimentam de insetos, vivem em pastagens e estão distribuídos em quase todo território brasileiro.

Atualmente, existem criatórios que comercializam esses pássaros, visto que são procurados para competir em torneios de canto. Além disso a criação em cativeiro se torna viável, pois a criação comercial é uma forma de preservar a espécie, desde que o criatório possua regularização e requisitos de bom manejo, pois tal como todos os passeriformes, estes podem ser acometidos de diversos tipos de doenças, sejam infecciosas ou parasitárias.

Dentre os vários problemas sanitários que afetam aves silvestres, as enfermidades parasitárias, estão entre as mais frequentes. Elas podem causar desde infecções subclínicas até o óbito, interferindo inclusive no comportamento e desenvolvimento reprodutivo das aves. Em cativeiro, as consequências de uma nutrição inadequada e o estresse podem aumentar o aparecimento de infecções infectocontagiosas e parasitárias, agravadas por infecções secundárias de agentes oportunistas. Doença parasitária como a coccidiose é uma enfermidade mundialmente distribuída tanto em aves de vida livre como as criadas em cativeiro. Esta é causada por protozoários do gênero *Eimeria* e *Isospora*, que afetam substancialmente a mucosa intestinal principalmente de Passeriformes, Psittaciformes e Piciformes. Além destes, o *Cryptosporidium* também pode infectar aves, levando a imunossupressão devido a atrofia da bursa de Fabricius e a perda de microambiente causada pela destruição do epitélio bursal. A criptosporidiose é uma enfermidade que tem relevante importância por ser considerada como zoonose.

Portanto, as coccidioses devem ser diagnósticas, para evitar prejuízos para plantis e, também, para a fauna, visto que há poucos estudos relacionados a doenças parasitárias em *Sicalis flaveola*. Coccídios como *Isospora spp.* e *Eimeira spp.*, possuem especificidade pelo seu hospedeiro, porém *Cryptosporidium spp.* pode ser transmitido a outras espécies, inclusive ao homem, logo estudos devem ser realizados periodicamente para diagnósticos desses protozoários.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar morfológicamente e morfometricamente as espécies de coccídeos parasitas de canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre e mantidos em cativeiros de criatórios e lojas de agropecuárias que comercializam essa espécie nas cidades de Campos dos Goytacazes e Itaocara no Rio de Janeiro, bem como nas cidades de Cachoeira Alegre, Eugenópolis e Muriaé em Minas Gerais.

2.2. ESPECÍFICOS

- Identificar qualitativamente e quantitativamente a presença de *Isospora* spp. em fezes de canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre que vivem em regiões urbanas e rurais, além das aves dessa espécie que são mantidas em criatórios comerciais e lojas especializadas em venda de pássaros;
- Identificar qualitativamente e quantitativamente a presença de *Eimeria* spp. em fezes de canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre que vivem em regiões urbanas e rurais, além das aves dessa espécie que são mantidas em criatórios comerciais e lojas especializadas em venda de pássaros;
- Identificar morfológicamente e molecularmente a presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre que vivem em regiões urbanas e rurais, além das aves dessa espécie que são mantidas em criatórios comerciais e lojas especializadas em venda de passaros;
- Comparar estatisticamente a eliminação quantitativa, qualitativa de *Isospora* spp. e *Eimeria* spp. em fezes de canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre e cativeiros, que vivem em regiões urbanas e rurais e criatórios comerciais e lojas especializadas na venda dessa espécie de ave.

3. JUSTIFICATIVA

Coccídeos são grandes causadores de perdas econômicas, devido à baixa produtividade dos plantéis acometidos. Esta enfermidade está presentes de forma enzoótica em criações de canário-da-terra, *S. flaveola*, com surtos epizoóticos relacionados a densidade populacional, fases do ciclo de criação, além de fatores climáticos. O parasita pode estar presente de forma enzoótica em pássaros de vida livre e é provável que estas aves alberguem espécies de coccídeos ainda não descritas e que a infecção possa gerar novas cepas devido à grande circulação nas diversas subespécies dessas aves que vivem em simpatrias umas com as outras. Essas cepas podem desencadear surtos epizoóticos nos pássaros confinados de criatórios ou comercializados.

Existem, ainda, poucos estudos sobre o diagnóstico de coccidiose em canário-da-terra, tanto de vida livre quanto os de cativeiro que são comercializados, e nenhum estudo comparativo da ocorrência destas parasitoses ou o comportamento do parasita, incluindo dados morfológicos, epidemiológicos e patológicos em animais confinados ou livres em seu habitat natural, inclusive associando ao impacto da doença e a ecologia dessas aves. Dessa forma, o conhecimento das espécies de coccídeos que circulam entres os pássaros e a presença quantitativa de oocistos em fezes de pássaros cativos e de vida livre são importantes para um controle eficaz da coccidiose em criatórios comerciais dessa espécie passeriforme.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*, LINNAEUS, 1766)

Os canários-da-terra, *S. flaveola*, são pássaros pertencentes à ordem Passeriforme, subordem Oscine, caracterizados por aves com dimensões diminutas e siringe mais complexa e desenvolvida, concedendo-lhes maior capacidade e habilidade canora (SILVEIRA e MÉNDEZ, 1999).

4.1.1. Classificação Científica

Seu nome científico significa: do (grego) *sikalis*, *sukallis* ou *sukalis* = pequeno; (Latim) *flaveola*, *flaveolus* diminutivo de *flavus* = amarelo ou amarelinho (WIKIAVES, 2022) e a classificação zoológica está esquematizada na figura 1.

IMPÉRIO - Eucariota (Whittaker e Margulis, 1978)
REINO - Animalia (Linnaeus, 1758)
FILO - Chordata (Bateson, 1885)
CLASSE - Aves (Linnaeus, 1758)
ORDEM - Passeriformes (Linnaeus, 1758)
Subordem - Oscine (Silveira e Méndez, 1999)
FAMÍLIA - Emberizidae (Howard e Moore, 1994)
Subfamília - Emberizidae (Howard e Moore, 1994)
GÊNERO - *Sicalis* (Linnaeus, 1766)
ESPÉCIE - *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766)
Subespécie -
Sicalis flaveola brasiliensis (Gmelin, 1789)
Sicalis flaveola pelzelni (Sclater, 1872)
Sicalis flaveola flaveola (Linnaeus, 1766)
Sicalis flaveola valida (Bangs e Penard, 1921)
Sicalis flaveola Koenigi (Hoy, 1978)

Figura 1. Classificação zoológica do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766). **Fonte:** MACHADO, L. O. M, 2009.

4.1.2. Comercialização e Conservação

O canário-da-terra, *S. flaveola*, sempre foi de grande interesse para a população devido às suas cores fortes e repertório vocal e por consequência foi capturado ilegalmente, além de comercializados no Brasil (STOTZ et al., 1996., SICK 1997). Assim a espécie é encontrada, comumente aprisionada, como ave de cativeiro (WIKIAVES, 2022). Segundo Destro et al. (2012), está entre as três espécies mais apreendidas, de acordo com o Sistema de Cadastramento, Arrecadação e Fiscalização (Sicaf) gerenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e de acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) a espécie encontra-se como pouco ameaçada (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2018), provavelmente graças à ação das autoridades e da conscientização da população, visto que, os registros do canário-da-terra-verdadeiro vêm se tornando mais frequentes nos últimos anos (WIKIAVES, 2022).

Pássaros desta espécie têm comportamento territorialista muito evidente, tanto os machos como as fêmeas defendem seu território utilizando o combate físico. Esta característica propiciou possivelmente o surgimento da criação destes pássaros para competição e o surgimento de rinhas (COBRAP, 2008).

Provavelmente é uma das espécies brasileiras que mais se reproduz em cativeiro, o que atesta a popularidade e o potencial desta espécie para fins de criação comercial, dentro dos moldes legalmente estabelecidos pelo IBAMA (SILVEIRA e MÉNDEZ, 1999).

Os canários-da-terra são muito comuns em torneios de canto realizados entre criadores em todo o Brasil. Segundo a Federação Ornitológica do Brasil (FOB), existem 4.500 criadores associados, que realizam, há 63 anos um campeonato nacional anual, atualmente em sede própria na cidade de Itatiba-SP, onde alberga aproximadamente 20.000 canários provenientes de todas as regiões do país. No mesmo evento, há uma seção reservada para vendas, na qual são alojados 20.000 pássaros ornamentais, além daqueles que participam do campeonato (NARDI, 2015).

4.1.3. Morfologia

Os canários-da-terra, *S. flaveola*, possuem entre 11-15 cm com marcado dimorfismo sexual. Os machos apresentam o alto da cabeça alaranjado brilhante,

ultrapassando a região da órbita, dorso oliva, com poucas estrias. Possuem ventre amarelo e brilhante, as asas e caudas marrom-escuras com as bordas das penas amarela (RIDGELY e TUDOR 1989).

As fêmeas e jovens, possuem finas estrias na cabeça e no dorso, crisso amarelado, além de um distinto colar amarelo estriado no peito, dividindo a garganta e o ventre, que são esbranquiçados. Já as fêmeas mais velhas tendem a ter o peito e o ventre mais amarelados, podendo lembrar a plumagem de machos (SILVEIRA e MÉNDEZ, 1999). A íris é negra e o bico tem a parte superior na cor cinza e a inferior é amarelada. Com quatro a seis meses de idade, os filhotes machos já estão cantando, e levam cerca de 18 meses para adquirir a plumagem de adulto (WIKIAVES, 2022).

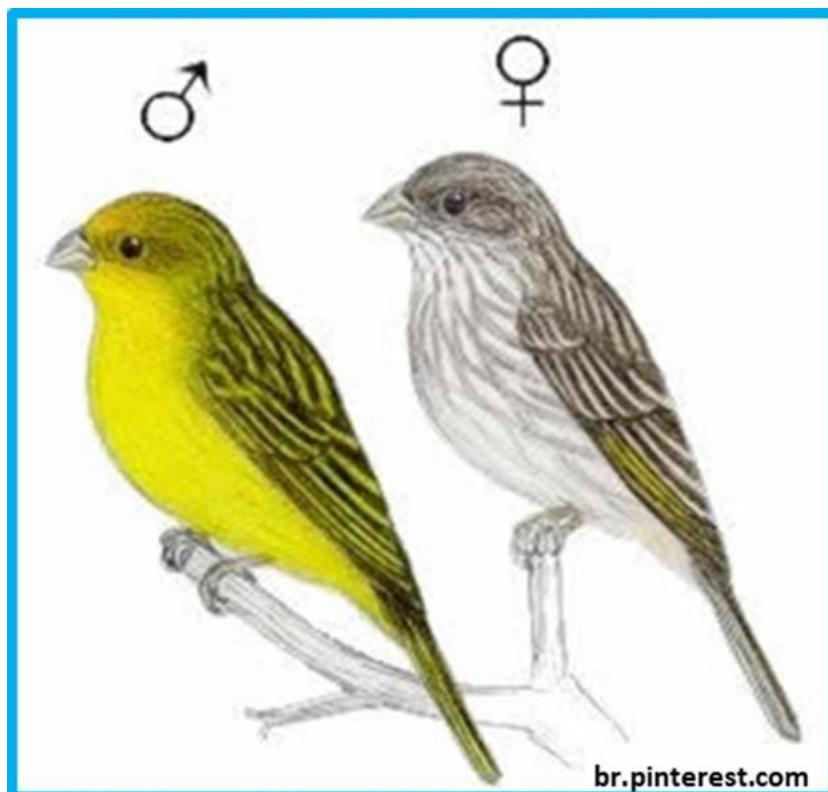


Figura 2. Dimorfismo sexual do canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, adultos. **Fonte:** Pinterest.com.br

4.1.4. Reprodução

Segundo Bushinelli (1971), as primeiras contribuições sobre a biologia

reprodutiva das espécies vêm do Brasil, de cinco ninhos em cativieiro com os quais foram determinadas a estação reprodutiva e o tamanho da postura. Este autor cita ainda que no Brasil, a época de reprodução e acasalamento tem variações de datas e períodos, conforme a região. No entanto, o auge da reprodução, ocorre nos meses de dezembro até março.

Na natureza, o ciclo reprodutivo tem relação com as estações do ano. As aves dependem, para enfrentarem este ciclo, de um fator primordial: o alimento, que é fornecido aos ninhegos. Na maioria das vezes, o alimento está na dependência do regime pluvial. Assim, na primavera e no verão, com o aumento das chuvas e do calor, aumenta também a quantidade de insetos, de sementes, de vegetais e de frutas. Por isso, neste período, ocorre a reprodução destes pássaros (COBRAP, 2008).

Seus ninhos são feitos e cobertos na forma de uma cestinha, em lugares que variam desde crânios de animais mortos “caveira de boi” penduradas em mourões, até bambus perfurados. Frequentemente utiliza ninhos abandonados de outros pássaros, sobretudo do João-de-barro, *Furnarius rufus*. Pode fazer ninhos em forma de cesta em plantas epífitas (orquídeas e bromélias), em buracos de telhas e outros locais que ofereçam proteção. A fêmea põe em média quatro ovos, que são chocados por 14 ou 15 dias, podendo chocar até três vezes no mesmo local (WIKIAVES, 2022).

A reprodução realizada em criatórios utiliza vários métodos, porém o mais utilizado é o método tradicional (como ocorre na natureza) denominado monogâmico, com macho junto com a fêmea, isto é, um casal por gaiola de criação. Os reprodutores são soltos juntos, ou, o macho é solto primeiro, pois se ocorrer o inverso, a fêmea pode tornar-se agressiva e rejeitar o macho. Nestes casos, durante a briga, podem ocorrer lesões ou até a morte de um dos reprodutores. O casal pode criar de duas a quatro ninhadas, em cada período anual de reprodução e após deve ser retirado os ninhos (caixinhas adicionadas pelo criador), para que os pássaros possam se recompor (COBRAP, 2008).

4.1.5. Alimentação

Se alimentam em grupos, onde a maioria dos membros são juvenis (MARCONDES-MACHADO, 1988). O formato do bico é eficiente em esmagar e seccionar as sementes, sendo, portanto, considerado predador e não dispersor de sementes. Costuma frequentar comedouros com sementes e quirera de milho, alé,

de alimentarem de insetos, restos de ração de animais domésticos, quando há proximidade com estes (MACHADO, 1988).

Já a alimentação dos canários-da-terra nativos de cativeiro, a base da alimentação é constituída por uma mistura contendo alpiste, *Phalaris canariensis*, painços, *Panicum miliaceum*, e variedades, senha, *Echinochloa crus-galli*, além de níger, *Guizotia abyssinica*, sendo o primeiro em maior quantidade (50% a 60%), ou então, por ração extrusada, fabricada sob medida para atender às necessidades nutricionais dos pássaros. Uma fonte de cálcio é fornecida o ano todo, principalmente para as fêmeas, que utilizam grandes quantidades deste mineral na composição da casca dos ovos. A farinha de ostra e o “osso de siba”, são as melhores alternativas para o fornecimento de cálcio, além disso a administração de polivitamínicos e um complexo de aminoácidos na água algumas vezes por semana é necessário, por exemplo, em época da muda, quando há filhotes no ninho ou recém-separados (COBRAP, 2008).

4.1.6. Distribuição

São pássaros (Figura 3) de formações abertas, forrageiam no solo ou próximo a ele (SICK, 1997), e sua distribuição estende-se desde a América Central a América do Sul, com introdução no Havaí, Panamá, Porto Rico e Jamaica (RIDGELY e TUDOR 1989). Na América do Sul (Figura 3A), são reconhecidas cinco subespécies: *Sicalis flaveola pelzeni* (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai e Chile); *Sicalis flaveola brasiliensis* (Brasil); *Sicalis flaveola flaveola* (Colômbia e Venezuela); *Sicalis flaveola valida* (Equador e Peru) e *Sicalis flaveola koenigi* (Argentina) (RISING et al., 2011). No Brasil (Figura 3 B), os canários-da-terra estão presentes em quase todos os estados brasileiros (WIKEAVES, 2022).

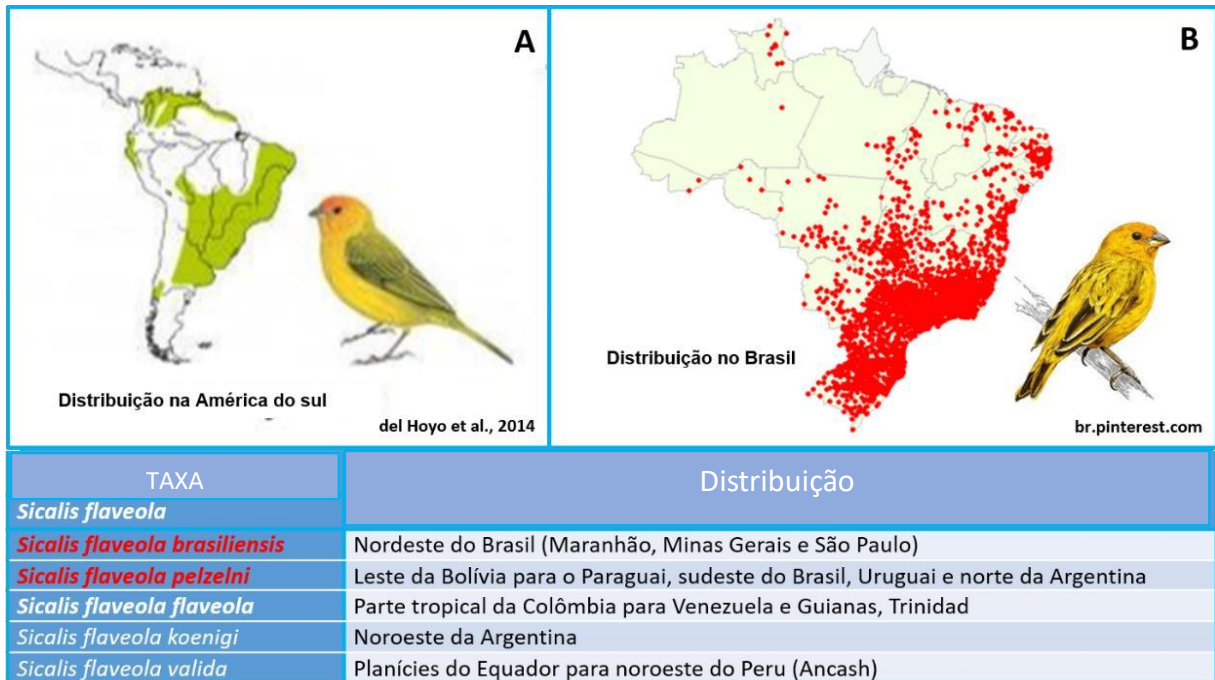


Figura 3. Distribuição do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766) na América do Sul (A) e Brasil (B). Em destaque (vermelho) as subespécies de ocorrência no Brasil. **Fonte:** (DEL HOYO et al., 2014).

4.2. AVES SILVESTRE EM CATIVEIRO

Aves em cativeiro possuem maior suscetibilidade a doenças virais, bacterianas, micóticas e parasitárias, porém a mais representativa e considerada uma grande causadora de mortalidade por enterite em muitas espécies de aves é a coccidiose. Esta doença é causada por protozoários da família Eimeriidae, onde estão incluídos os gêneros *Eimeria* e *Isospora* (FREITAS et al., 2003; SCHRENZEL et al., 2005; SAKS et al., 2006).

Muitos desses casos estão relacionados a superlotação nos cativeiros, gerando um estresse de confinamento, e toda essa carga parasitária leva a um desgaste do animal, resultando em disfunção de órgãos internos, desidratação e perda de energia. Fatores inerentes ao confinamento aumentam a possibilidade de disseminação e manutenção de inúmeros patógenos. Normalmente as instalações possuem pouca ventilação, proteção à ação de chuvas e raios solares, acúmulo de materiais orgânicos, entre outros (MARINHO et al., 2010).

Os casos detectados em cativeiro são importantes para se avaliar a intensidade da coccidiose e o impacto que pode ser gerado em populações naturais,

pois estes parasitas intestinais estão associados a ecologia das aves (DOLNIK, 2006), influenciando na biodiversidade de populações naturais, uma vez que, os parasitos causam impactos tanto na sobrevivência como na reprodução de seus hospedeiros (MARTÍNEZ-PADILLA e MILLÁN, 2007).

4.3. COCCIDIOSE EM AVES

Os coccídios de maior importância veterinária incluem os gêneros *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*, podendo causar grandes perdas econômicas, principalmente na criação de aves (SHIRLEY, 1992). A coccidiose custa à indústria avícola 3,5 bilhões de dolar em perdas anuais em todo o mundo (AVISITE, 2021).

A patogenicidade da infecção depende da espécie do coccídeo envolvido na infecção e do número de oocistos infectantes ingeridos (LIMA, 2004), do grau de virulência das cepas envolvidas e suscetibilidade do hospedeiro (KAWAZOE, 2000), do número de células hospedeiras destruídas e localização do parasita no hospedeiro (FITZGERALD, 1980). Esses fatores podem diferir em importância de acordo com a idade e a espécie do hospedeiro acometido (SHIRLEY, 1992).

A manifestação clínica é caracterizada por mortalidade, morbidade, diarreia sanguinolenta ou não, e alteração no desempenho das aves. A doença pode também se apresentar na forma subclínica com as alterações ainda não conhecidas nessa forma de infecção. Sabe-se que nesse caso, haverá redução no ganho de peso e na conversão alimentar, porém sem os sinais evidentes da doença no hospedeiro (WILLIAMS, 2002).

Alteração no pH do conteúdo intestinal é uma característica observada na fase aguda da infecção por *Eimeria* spp., e este tem influência direta sobre a digestão e absorção dos nutrientes (COLNAGO, 1999). Essa alteração pode ser devido à modificação no equilíbrio de microorganismos intestinais de aves infectadas com este coccídeo (LUQUETTI et al., 2006).

Todos os coccídeos do filo Apicomplexa que possuem estágios de invasão, contendo esporozoítos, merozoítos, taquizoítos e cistozoítos apresentam polos apicais extremamente especializados, com organelas que permitem que o parasita entre nas células dos hospedeiros (SHIRLEY, 1992). Nestes, a forma esporulada dos oocistos é utilizada para fazer a diferenciação de certos gêneros através de sua

estrutura (BROWN et al., 2010).

4.3.1. Sinais clínicos

Os sinais clínicos dependerão do dano causado nas células intestinais pelas formas endógenas parasita e o dano tecidual que resultará na interrupção da alimentação, má absorção de nutrientes, comprometimento do processo digestivo, além de aumentar a suscetibilidade a outros agentes oportunistas (PEREIRA, et al. 2013). O animal infectado pode ser assintomático ou sintomático. Os sinais clínicos variam conforme as espécies de coccídios envolvidos na infecção, algumas espécies patogênicas causam diarreia que varia de mucóide a sanguinolenta, desidratação, penas arrepiadas, anemia, despigmentação da pele e prostração, dentre outros sinais clínicos (ALLEN e FETTERER, 2002).

A infecção parasitária pode interferir no comportamento e no desenvolvimento reprodutivo das aves, em virtude de uma nutrição inadequada e estresse, além de propiciar o aparecimento de infecções secundárias (FREITAS et al., 2002).

4.3.2. Epidemiologia

Aves infectadas no início da vida podem desenvolver imunidade contra futuras infecções, assim, a infecção tardia pode levar a doença grave em aves mais velhas que não foram previamente expostas, conforme apontado por McDougald e Reid (1995). Animais mais velhos submetidos a certas condições tais como estresse, doenças concomitantes e falta ou diminuição de imunidade podem desenvolver a coccidiose (LIMA, 2004). Aves mais jovens são mais resistentes à infecção por coccídeos quando comparadas a aves mais velhas (LONG e MILLARD, 1979).

Em contrapartida, Svobodová e Cibulkova (1995), afirmam que aves jovens são susceptíveis de serem infectadas inicialmente pelos pais ou pelo ambiente já que oocistos esporulados podem permanecer infectantes de uma época de reprodução para outra, podendo ser dispersos pelo vento, água ou outros animais.

O grande número de oocistos excretados por hospedeiros infectados (CHAPPEL et al., 1996), a dosagem baixa necessária para a infecção (DUPONT et al., 1995), a falta de especificidade de hospedeiro para alguns coccídeos (O'DONOGHUE, 1995), a resistência desses oocistos a pressões ambientais e a falta

de tratamento da água oferecida aos animais, são fatores que contribuem para o aumento de casos de coccidiose (KORICH et al., 1990; ROBERTSON et al., 1992; FAYER, 1994; FAYER e NERAD, 1996).

O clima pode contribuir diretamente sobre a sobrevivência de oocistos de *Eimeria* spp. e *Isospora* spp., além de muitos outros coccídeos. Eles são capazes de sobreviver em períodos mais úmidos e frios, enquanto que períodos quentes e secos podem inviabilizar esses oocistos (FERREIRA, 2008).

Fernando (1982) considera que em regiões de clima temperado, a esporulação é interrompida nos meses de inverno e retorna durante a primavera o que não se aplica ao Brasil onde a esporulação acontece em todas as estações do ano.

Outro fator importante para eliminação dos oocistos implica o estado nutricional do hospedeiro. Fatores estressantes como cio e condições extremas de clima também podem levar a uma maior eliminação de oocistos (FAYER, 1980) e neste caso podemos acrescentar os períodos reprodutivos dos pássaros.

4.3.3. Prevenção e profilaxia

Autores relatam que a prevenção de enfermidades como a coccidiose está associada a um programa de integração, que se baseia no uso de anticoccidianos, emprego de sanitizantes e produtos de controle sanitário (AMARAL e OTUTUMI, 2013).

A alta densidade de aves gera maior contaminação do ambiente com os oocistos e isso aumenta a chance do aparecimento da doença nas criações (SHIRLEY, 1992).

A água deve ser livre de patógenos e passar por exames anuais para garantia de sua qualidade (TULLY e SHANE, 1996). Bebedouros e comedouros atuam como fontes de infecção, pois podem ser contaminados com fezes de animais, favorecendo o aparecimento da doença e, portanto, devem ser colocados de forma a evitar sua contaminação (LIMA, 2004).

As aves de uma criação devem passar por métodos de análise parasitológicos e um período de quarentena antes de sua introdução. A eficácia das drogas utilizadas no tratamento de coccidiose intestinal depende da espécie de coccídeo e também da espécie de ave envolvida (GREINER e RITCHIE, 1994). Um método de controle eficiente é a administração contínua de anticoccidianos

adicionados à água ou ração. Embora esta prática seja usada como rotina para prevenir a coccidiose de aves, somente nos últimos anos tem sido introduzida na criação de outras espécies de animais (LIMA, 2004). Doses inadequadas de drogas anticoccidianas podem levar ao aparecimento de resistência dos coccídeos (SHIRLEY, 1992).

4.4. COCCÍDEOS DE PASSERIFORMES

A coccidiose, também conhecida como Eimeriose, Isosporose e Criptosporidiose são causadas por protozoários intracelulares parasitas, pertencentes ao filo Apicomplexa, que possuem importância zootécnica. Entretanto, o gênero *Isospora* spp. é mais frequente em Passeriformes, Psittaciformes e Piciformes, enquanto as espécies do gênero *Eimeria* são observadas em Galliformes e Columbiformes (GREINER e BITCHIE, 1994).

Os hábitos alimentares das aves são determinantes pela a instalação da infecção por coccídeos, pois o ciclo dos parasitos são oro-fecal. Há uma correlação de menor prevalência em pássaros insetívoros do que em onívoros e granívoros, que muitas vezes se alimentam diretamente no solo, favorecendo a transmissão oral-fecal (DOLNIK, 2006; DOLNIK et al., 2010). Os oocistos esporulados podem ser ingeridos pelo pássaro, ainda, no ninho, durante a alimentação realizada pelos genitores (SVOBODOVA e CIBULKOVA, 1995).

De acordo com Berto et al. (2014) os coccídios tem como característica fundamental o parasitismo intracelular obrigatório com ciclos biológicos alternados entre reprodução assexuada e sexuada. Diversas espécies de coccídeos ocorrem em uma mesma espécie de ave e a maioria dessas espécies não é patogênica, demonstrando a importância não apenas quantitativa, mas também qualitativa de seu diagnóstico (GALLO et al., 2014). Dentre as doenças que acometem pássaros a coccidiose é considerada uma importante causa de enterite e morte das espécies.

4.4.1. Coccidiose em passeriformes

As patologias de aves geralmente estão relacionadas com a nutrição, tipo de alojamento e estresse sofrido por estes animais, por isso, alguns cuidados e medidas são necessários para minimizar o estresse e manter os mecanismos de defesa do

animal (HUEZA, 2008). Entre as patologias mais relevantes ocasionadas em pássaros mantidos em cativeiro estão: distúrbios nutricionais, doenças virais, bacterianas, micóticas e parasitárias (GODOY e MATUSHIMA, 2010).

No entanto, a coccidiose é considerada uma grande causadora de enterite e morte em todas as espécies de aves, esta doença é causada por protozoários da família Eimeriidae, incluindo *Isospora* e *Eimeria* (FREITAS et al., 2003; SCHRENZEL et al., 2005; SAKS et al., 2006). Este tipo de patologia acomete com mais frequência pássaros mantidos em cativeiro, porém, poucas são as publicações que relatam procedimentos de manejo, nutrição e principalmente o uso de medicamentos em pássaros silvestres (HUEZA, 2008).

Sabe-se, no entanto, que grande parte das mortes registradas em aves brasileiras vindas do tráfico de animais silvestres são causadas por doenças infecciosas, entre elas a coccidiose (GODOY e MATUSHIMA, 2010). Os relatos de surtos da coccidiose, entre os animais mantidos em cativeiro estão associados com a superlotação, confinamento e estresse (GODOY, 2007).

A relação entre a carga parasitária e a saúde individual influenciam no sucesso da infecção, os coccídios induzem um consumo maior de energia, disfunção de órgãos internos, reações imunes e doença clínica, mas a infecção subclínica é muito comum, estando associada à superlotação e ao estresse, causando desidratação em animais jovens que apresentam diarreia mucoide ou com sangue, pode também ocasionar destruição da mucosa intestinal, ocorrendo má absorção e anemia, isto em relatos mais intensos (CLYDE e PATTON, 1996; ZINKE et al., 2004).

Tyzzar foi um pioneiro nos estudos sobre a coccidiose nas aves, estabelecendo conceitos sobre a biologia dos coccídios. Nesses estudos, esses organismos foram considerados parasitos homoxenos e das células epiteliais da mucosa intestinal. As descrições dos ciclos de vida foram confirmadas mais tarde nas revisões de Levine (1985) e Ball et al. (1989). Os estudos sobre as espécies do gênero *Eimeria* em Passeriformes eram limitados às descrições de oocistos. Entretanto, há uma escassez de informação em relação aos ciclos de vida desse gênero em Passeriformes (BERTO et al., 2008; 2009).

Considerando outras ordens de Aves, é reconhecido que a maioria das espécies de *Eimeria* tem ciclos intestinais (LEVINE, 1985; BALL et al., 1989), no entanto, há algumas exceções (BERTO et al., 2011a).

Na ordem passeriformes, somente em 2008 o gênero *Eimeria* foi descrito pela primeira vez infectando passeriformes nas Américas (BERTO et al., 2008; BERTO et al., 2011a).

4.5. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico de parasitas causadores da coccidiose através da dimensão e morfologia dos oocistos exige treinamento além de ser uma técnica demorada (LONG et al., 1976). Espécies de *Eimeria* podem ser diferenciadas com base na morfologia, especificidade de hospedeiro, localização e características macroscópicas das lesões (KAWAZOE, 2000). A discriminação das espécies através da visualização de seus oocistos é restrita a pequenas diferenças e por isso, se torna limitada. Devido a isso, desde o final da década de 90, a abordagem molecular tem sido utilizada para identificar as espécies com maior precisão (SCHNITZLER et al., 1999).

A técnica de PCR multiplex pode ser utilizada como uma ferramenta para identificar simultaneamente as sete espécies conhecidas por infectar galinhas domésticas (FERNANDEZ et al., 2003). Para que isso seja possível foram desenvolvidos 138 marcadores para diagnóstico molecular de *Eimeria* spp. em aves comerciais (QUEVEDO e GRUBER, 2004). Outra forma de diagnóstico é através da presença de anticorpos anti-coccidianos específicos que podem ser detectados por vários métodos sorológicos, especialmente ELISA, cujos níveis aumentam significativamente após a infecção com várias espécies de *Eimeria* (KANYARI, 1988; FABER et al., 2002).

O diagnóstico laboratorial da infecção por *Isospora* spp. é feito rotineiramente pela observação e identificação microscópica dos oocistos nas fezes. Aspirados duodenais e biliares, além de biopsia intestinal também podem conter os oocistos. Essas técnicas rotineiras podem ser empregadas uma vez que os oocistos são visíveis ao microscópio óptico com ou sem corante (De CARLI e MOURA, 2001).

A eliminação de Oocistos de *Isospora* spp., em quantidades pequenas nas fezes, pode-se associar técnicas de coloração juntamente com métodos de concentração. Esses métodos correspondem mais comumente a centrífugo-flutuação em solução de sacarose ou sulfato de zinco, centrífugo-sedimentação em sistema formalina-éter e coloração derivada de Ziehl-Neelsen (De CARLI e MOURA, 2001).

Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. o método de coloração ácido

resistente continua sendo o mais utilizado para a identificação de oocistos (FAHEY, 2003), devido ao baixo custo, fácil execução e utilização de microscópio óptico comum. Duas técnicas de coloração são utilizadas: Kinyoun e Ziehl-Neelsen (XIAO e CAMA, 2006).

4.6. *Isospora* spp.

Segundo Lindsay e Blagburn (1994), a doença causada por *Isospora* spp. é pouco frequente em primatas não-humanos, cães e gatos, e não causa enfermidade em cavalos, ruminantes domésticos ou aves domésticas. No entanto, são hospedeiros específicos e compreendem numerosas espécies que parasitam mamíferos e aves (BERENQUER, 2006) e já foram encontradas em Struthioniformes, Falconiformes, Galliformes, Coraciformes, Charadriiformes e Strigiformes (PATTON, 1993), além de Passariformes (COELHO et al., 2011).

A doença causada por *Isospora* spp. é conhecida como isosporíase e causa inúmeras alterações na função e estrutura intestinal. As principais alterações observadas são atrofia das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas (GARCIA e BRUCKNER, 1997). A infecção por este protozoário intestinal é incomum no homem (DESSPORTES-LIVAGE e DATRY, 2005) e está associado com diarreia severa, em particular com pessoas HIV positivas (LEWTHWAITE et al., 2005).

4.6.1. Posição taxonômica

Reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Conoidasida (Levine, 1988)

Ordem: Eucoccidiorida (Léger e Duboscq, 1910)

Família: Eimeriidae (Minchin, 1903)

Gênero: *Isospora* (Schneider, 1881)

4.6.2. Aspectos Morfológicos e Espécies

Coccídeos do gênero *Isospora* são dispóricos tetrazóicos o que significa que possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (GARCIA e BRUCKNER, 1997). Oocistos de *Isospora* spp. possuem paredes mais uniformes sendo necessário observar outras características tais como corpo de Stieda e Sub-Stieda (CASAS et al., 1995). Em muitas espécies de mamíferos não se observa corpo de Stieda, enquanto que em muitas espécies de aves ele está presente (LINDSAY e BLAGBURN, 1994).

Duas espécies de *Isospora* foram descritas por Coelho et al. (2011) em *S. flaveola* foram identificadas como *Isospora cetasiensis* e *Isospora sicalisi*. Os dados morfológicos e morfométricos podem ser vistos na figura 4 e quadro 1, respectivamente.

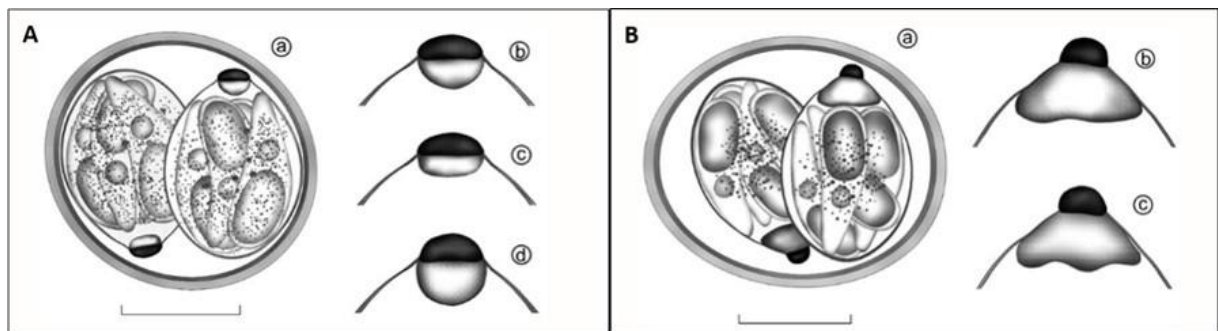


Figura 4. Morfologia de *Isospora* spp. observados em fezes do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766). Em A *Isospora cetasiensis*, em B *Isospora sicalisi*, (a) oocisto esporulado com suas respectivas variações de corpos de Stieda e Substieda (b-d). Barra de escala = 10 μ m para oocistos e 5 μ m para corpos de Stieda e Substieda (COELHO et al., 2011).

Quadro 1. Dados comparativos da morfologia e morfometria de espécies de *Isospora* observados em fezes do canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766), segundo Coelho et al. (2011).

DADOS	COCCÍDEOS	
	<i>Isospora cetasiensis</i>	<i>Isospora sicalisi</i>
Morfológicos e Morfométricos		
Oocisto		
Forma	Semiesférico a elipsoidal	Semiesférico a elipsoidal
Parede	Duas camadas (~ 1,0 μ m)	Duas camadas (~ 1,1 μ m)
Grânulo polar	Ausente	Ausente
Diâmetro maior (μ m)	23,1 (19-27)	27,5 (25-29)
Diâmetro menor (μ m)	21,6 (19-26)	25,2 (22-28)

Índice morfométrico (μm)	1,1 (1,0-1,2)	1,1 (1,0-1,2)
Esporocisto		
Forma	Ovoide	Elipsoidal
Corpo de Stieda	Saliente (forma de botão)	Saliente (forma de botão)
Corpo de substieda	Arredondada	Trapezoidal
Diâmetro maior (μm)	15,1 (13-19)	17,2 (15-19)
Diâmetro menor (μm)	10,9 (10-13)	11,7 (11-12)

4.6.3. Ciclo Biológico

Espécies de *Isospora* spp. possuem ciclo semelhante ao das espécies de *Eimeria* (PAGE e HADDAD, 1995). Após ingestão do oocisto esporulado ocorre a excitação no intestino delgado do animal. Os esporozoítos liberados penetram nas células epiteliais intestinais e dão início a reprodução assexuada formando muitos merozoítos. Após invasão das células pelos merozoítos, inicia-se a fase sexual e posterior formação do oocisto. Estes oocistos deixam as células epiteliais e são liberados nas fezes com uma parede dupla.

Segundo Patton (1993), no ambiente ocorrerá esporulação deste oocisto se as condições necessárias de umidade, temperatura e oxigenação estiverem adequadas. Os oocistos de *Isospora* spp. são muito resistentes no meio ambiente, podendo permanecer viáveis durante meses em locais frescos e úmidos (PEREIRA et al., 2009). Um hospedeiro de transporte ou paratêmico pode estar envolvido em seu ciclo de vida.

As infecções mais graves causadas pelo gênero *Isospora* envolvem aves muito jovens ou imunocomprometidas, mas o mais comum é que as infecções causadas por este coccídeo sejam assintomáticas (PAGE e HADDAD, 1995).

4.7. *Eimeria* spp.

Os primeiros coccídios foram observados na bile de um coelho por Antoni van Leeuwenhoek em 1674, utilizando um microscópio rudimentar. Provavelmente, em 1839, Hake foi o primeiro pesquisador a observar os oocistos mais detalhadamente; no entanto, ele os considerava como glóbulos de pus. Em 1846, Kloss assinalou a presença de coccídios em um caramujo, que foi posteriormente nomeado de *Klossia helicina* Schneider, 1875. Quase 20 anos depois, Lindemann, em 1865, ao avaliar

ocistos presentes na bile de um coelho descreveu a espécie *Monocystis stiedae* Lindemann, 1865, considerando-a como uma gregarina (CHISHOLM, 1911; WENYON, 1926).

Berto et al. (2011b), citam que em 1869, Rivolta deve ter feito a primeira observação de um coccídio em aves, ao recuperar oocistos de coccídios destes em outros pássaros. Estes citam ainda, que embora esse mesmo autor tenha observado que havia divisão em duas massas no conteúdo de alguns oocistos, essas não foram diferenciadas ou caracterizadas, sendo simplesmente descrito como *Psorospermium avium*, Rivolta 1869. Berto et al. (2011b), cogitam que em verdade, Rivolta e Silvestrini em 1873, também se referiram a esse coccídio, considerando todos coccídios de aves como pertencentes a esse mesmo táxon.

4.7.1. Posição taxonômica

Reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Ordem: Eimeriida (Leger, 1911)

Família: Eimeriidae (Minchin, 1903)

Gênero: *Eimeria* (Schneider, 1875)

4.7.2. Aspectos Morfológicos e Espécies

As espécies de *Eimeria* são identificadas com base na dimensão, morfologia e tempo mínimo de esporulação dos oocistos, especificidade do hospedeiro (são parasitas espécie-específicos), sítios de colonização, características das lesões, período pré-patente e especificidade imunológica (LONG e JOYNER, 1984; LONG et al., 1976).

Estes parâmetros analisados de forma conjunta permitem a distinção das espécies de *Eimeria*, entretanto, nem sempre o diagnóstico é confiável; principalmente quando há infecções mistas. Desta forma, técnicas baseadas em métodos

moleculares também têm sido utilizadas. Tem se desenvolvido um método de diagnóstico de espécies por PCR multiplex baseado num conjunto de marcadores moleculares denominados SCARs (*Sequence - Characterized Amplified Regions*), os quais permitem a diferenciação e o diagnóstico de sete espécies simultaneamente (FERNANDEZ et al., 2003).

4.7.2. Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Eimeria* apresentam um ciclo de vida monoxênico que se inicia quando um hospedeiro susceptível ingere um oocisto esporulado (MCDUGALD e REID, 1995). O oocisto, ao ser ingerido é rompido na moela por trituração mecânica, liberando os esporocistos. No intestino, devido à ação de sais biliares e tripsina, os esporozoítos saem ativamente do esporocisto e penetram nas células epiteliais intestinais. Nesta etapa há vários ciclos intestinais endógenos nos quais os parasitas se multiplicam por fissão múltipla (merogonia ou esquizogonia) resultando na formação de esquizontes, os quais contêm os merozoítos (NOVAES et al., 2011).

Em seguida, há a fase sexuada do ciclo, gamogonia ou gametogonia, onde os merozoítos diferenciam-se em macrogametócito, gamonte feminino ou microgametócito, gamonte masculino. Após a fecundação do macrogameta pelo microgameta há a formação do oocisto que é liberado no ambiente juntamente com as fezes. Sob condições favoráveis de temperatura, oxigênio e umidade, o oocisto sofre um processo de esporogonia ou esporulação envolvendo meiose e mitose resultando na formação do oocisto esporulado que contém quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (NOVAES et al., 2011).

4.8. *Cryptosporidium* spp.

Primeiramente, o coccídeo foi encontrado na mucosa gástrica de um camundongo e denominado *Cryptosporidium muris* (do latim, *Crypto*: ausente, oculto; *Sporidium*: esporo) por não apresentar esporocistos, apenas esporozoítos no interior de oocistos (TYZZER, 1907). Este gênero possui mais de 30 espécies e genótipos que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (HOLUBOVÁ et al., 2016; LI et al., 2015).

A criptosporidiose, como é chamada a doença, é uma das infecções parasitárias mais prevalentes na classe das aves, tanto as domesticadas quanto as silvestres (O'DONOGHUE, 1995; SRETER e VARGA, 2000). Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* têm sido registrados em mais de 30 diferentes espécies de aves no mundo (ZAHEDI et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) caracteriza a criptosporidiose como uma doença negligenciada pela falta de iniciativa de controle da circulação deste protozoário e sua estreita relação à população com baixo poder aquisitivo e precárias condições de saneamento básico (SAVIOLI et al., 2006).

4.8.1. Posição taxonômica

Reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Ordem: Eimeriida (Leger, 1911)

Família: Cryptosporidiidae (Léger, 1911)

Gênero: *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907)

4.8.2. *Cryptosporidium* spp em aves

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em aves foi descrito por Tyzzer em 1929, no epitélio cecal de galinhas jovens (SLAVIN, 1955; CURRENT et al., 1986; RYAN et al., 2003a)

Diversas espécies de aves pertencentes a várias ordens são infectadas por *Cryptosporidium* spp. Em passeriformes, há relatos da presença das seguintes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais: *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C. parvum* e dos genótipos I e III de aves. *Cryptosporidium baileyi* é a espécie mais frequentemente diagnosticada em aves, com relatos de enfermidade clínica ou subclínica em 11 ordens de aves, e é a espécie mais frequente em Galliformes. Já *C. galli* foi encontrado em diversas espécies de cinco ordens de aves,

com mais frequência em Passeriformes e Psittaciformes, enquanto *C. meleagridis* foi detectada em quatro ordens de aves, mas infecta preferencialmente perus e galinhas e esta é a única espécie aviária que infecta mamíferos, em infecções naturais ou experimentais (AKIYOSHI et al., 2003; DARABUS, 1997; DARABUS e OLARIU, 2003; SRÉTER e VARGA, 2000).

Estudos realizados em diversos países, com diversas espécies de aves, relatam prevalência de infecção por *Cryptosporidium* spp. variando de 0,8% a 44,4% (NAKAMURA e MEIRELES, 2015). Sevá et al. (2011) realizaram um estudo em aves silvestres, onde foi diagnosticado *C. galli* em sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*), trinca ferro (*Saltator similis*), cigarrinha do norte (*Sporophila schistacea*), pintassilgo comum (*Carduelis carduelis*), canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*); *C. baileyi* nas seguintes espécies: pintassilgo comum (*Carduelis carduelis*), pixoxó (*Sporophila frontalis*), cardeal do nordeste (*Paroaria dominicana*) e canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*) e *Cryptosporidium* genótipo aviário II em periquito maracanã (*Aratinga leucophthalma*).

Ng et al. (2006) pesquisaram a presença de *Cryptosporidium* na Austrália e identificaram quatro espécies: *C. galli*, *C. baileyi*, *C. andersoni* e *C. muris* em aves das ordens: Psittaciformes, Passeriformes e Galliformes. Os autores sugeriram que as aves podem ter um importante papel na epidemiologia de *Cryptosporidium* e que é necessário conhecer as adaptações entre parasitos e hospedeiros para compreender possíveis implicações em saúde pública.

Outros autores como Nakamura et al. (2009) estudaram aves mantidas em cativeiro e identificaram *C. baileyi* em urubu de cabeça preta (*Coragyps atratus*), em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e em canário da terra verdadeiro (*Sicalis flaveola*); *C. galli* em canário (*Serinus canaria*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e curió (*Oryzoborus angolensis*); *C. meleagridis* em galinha doméstica; *C. parvum* em calopsita; genótipo aviário I em canário e em um pavão-indiano (*Pavo cristatus*); genótipo aviário II em avestruz (*Struthio camelus*) e genótipo aviário III em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e agapornis (*Agapornis roseicollis*).

Antunes et al. (2008) identificaram *C. galli* nas ordens Passeriformes (canários e curiós). Tanto os passeriformes e psittaciformes apresentaram infecção crônica por *C. galli*, na maioria dos casos de natureza subclínica.

4.8.3. Morfologia de *Cryptosporidium* spp.

A forma infectante de *Cryptosporidium* spp., o oocisto esporulado, possui uma variação entre 3,3 a 8,4 µm de diâmetro (HARRIS e PETRY, 1999). Possui quatro esporozoítos no seu interior, sem a presença de esporocisto (TYZZER, 1907). Diferente de outros gêneros como *Toxoplasma*, *Isospora*, *Eimeria* e *Sarcocystis* cujos oocistos variam de 10 a 40µm, é difícil a identificação da espécie através do tamanho, formato ou estruturas internas, já que estas não são bem distinguíveis em microscópio (FAYER et al., 2000; XIAO e FAYER, 2008; MEIRELES, 2010).

Os esporozoítos são similares aos encontrados em outros coccídios, possuem um formato de vírgula com duas extremidades claramente distintas, nas quais a apical é estreita e a posterior é arredondada (TYZZER, 1912).

4.8.4. Ciclo biológico

Os oocistos infectantes de *Cryptosporidium* spp. ao serem ingeridos pelo hospedeiro após exposição ao suco gástrico e enzimas pancreáticas, ocorre a excitação, liberando quatro esporozoítos infecciosos no intestino delgado do hospedeiro, invadindo as células epiteliais das microvilosidade, onde todos os próximos estágios ocorrem (XIAO e FAYER, 2008).

Se inicia então a reprodução assexuada (merogonia), com liberação de merozoítos. Esses dão origem aos estágios sexuais, os microgametas e macrogametas, que se unem dando origem ao zigoto, o qual após duas divisões assexuadas formam o oocisto. A esporulação ocorre no interior do hospedeiro com desenvolvimento de quatro esporozoítos. Assim, são formados oocistos de parede delgada (capazes de propiciar a autoinfecção) e de parede espessa (altamente resistentes em condições ambientais e eliminados nas fezes). A infecção geralmente permanece localizada no trato gastrintestinal (THOMPSON et al., 2008). O ciclo destes protozoários necessita apenas de um hospedeiro para se completar (XIAO e FAYER, 2008).

4.8.5. Diagnóstico parasitológico

São utilizadas a coloração com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999), Kinyoun, Ziehl-Neelsen modificado e Centrifugo-flutuação em Solução de Sheather (LEVINE, 1978). Os métodos baseados em microscopia são os mais usados para o

diagnóstico do protozoário, por serem menos onerosos e de fácil execução. Embora, essas ferramentas diagnósticas possam fornecer dados sobre a ocorrência do parasito, somente a biologia molecular é capaz de determinar a positividade para o gênero *Cryptosporidium* com posterior sequenciamento para identificação da espécie (NAKAMURA et al., 2009).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. é realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O gene mais utilizado para determinação da espécie ou genótipo é o 18S rRNA. O gene da 60kDa glycoprotein (GP60) é utilizado para subtipagem de *C. meleagridis* em estudos de epidemiologia molecular. Também, pode ser realizada a PCR em tempo real, para diagnóstico específico de *C. galli* e genótipo III de aves (NAKAMURA et al., 2009).

Considerando a variedade de hospedeiros e ciclos de transmissão, juntamente à variação genética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp., é de fundamental importância a caracterização molecular de isolados brasileiros (MEIRELES, 2010). Outros loci utilizados são aqueles com maior polimorfismo, como os genes da actina (SULAIMAN et al., 2002), da proteína do choque térmico-HSP-70 e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000a).

4.8.6. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas causadas por *C. baileyi*, podem variar ocasionando desde acúmulo de muco na traqueia, nos pulmões e nos sacos aéreos até dispneia, coriza e óbito (RYAN et al., 2003a), já *C. galli* está associado com alta mortalidade (PAVLA'SEK, 1999; RYAN et al., 2003b) e *C. meleagridis* causa enterite e também mortalidades (SLAVIN, 1955).

Aves como perus, patos, gansos, calopsitas, codorna marrom, avestruzes, periquitos e falcões, já foram afetadas, com a espécie *C. baileyi* (SRÉTER e VARGAS, 2000), provocando alterações no proventrículo uma vez que o parasito se desenvolve nas células epiteliais deste órgão e não acomete os intestinos e nem o trato respiratório, além disso na literatura ressalta alguns relatos de criptosporidiose clínica em passeriformes (LINDSAY et al., 1991; CLUBB, 1997).

Lesões por este agente foram descritas em passarinhos, galinhas, papagaios, flamingos, pássaros exóticos e selvagens e a espécie *C. baileyi* pode relacionar-se

com o genótipo aviário IV (RYAN, 2010). *Cryptosporidium meleagridis* é responsável por enterite e mortalidade, sendo encontrado no epitélio intestinal e bolsa cloacal. Relatos de infecção em perus, papagaios, galinhas e calopsitas foram descritos (MORGAN et al., 2000), sendo essa espécie parasitária também detectada em humanos (XIAO e FAYER, 2008).

A ocorrência da infecção por *C. meleagridis* no ser humano é semelhante a *C. parvum* (CHALMER e GILES, 2010). Estudos que utilizaram a análise filogenética constataram a relação entre os isolados do homem e de aves, demonstrando que *C. meleagridis* possui importância em Saúde Pública (STENSVOLD et al., 2014).

Segundo Antunes et al. (2008) e Nakamura et al. (2009), infecções por *C. galli* poderiam ser responsáveis por proventriculite crônica em aves, predispondo-as a infecções secundárias por outros patógenos. Esta parasitose pode ser responsável por diarreia e mortalidade das aves (BLAGBURN et al., 1990; MORGAN et al., 2001; PAVLÁSEK, 1999; PAVLÁSEK, 2001).

Relatos de infecção por *Cryptosporidium* nos tratos gastrintestinal, respiratório e na Bursa de Fabricius, ocasionalmente estão relacionados a perdas econômicas e mortalidade (SRÉTER e VARGA, 2000).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAGEM

Foram utilizados 60 canários-da-terra, da espécie *S. flaveola*, destes 30 eram criados em gaiolas ou viveiros de criatórios ou de estabelecimentos que os comercializam em Campos dos Goytacazes-RJ, Itaocara-RG, Cachoeira Alegre-MG, Eugenópolis-MG e Muriaé-MG (colocar número por cidade). As outras 30 aves viviam em vida livre e habitavam regiões periurbanas e rurais da cidade de Eugenópolis-MG. A captura desses animais só foi possível devido a autorização para atividades com finalidade científica, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), através do protocolo 78016-1.

5.2. COLETA FECAL

5.2.1. Pássaros criados em cativeiro

Para o grupo de canário-da-terra, *S. flaveola*, criados em cativeiro, foram coletadas amostras fecais depositadas no fundo da gaiola durante o período de 24 horas. Em caso de um pássaro por gaiola, todas as fezes foram consideradas como de uma única amostra coletada. Previamente as bandejas de recolhimento das fezes das gaiolas foram lavadas e secas. Em seguida as bandejas foram forradas com duas camadas de papel, a primeira camada com “Papel absorvente” (toalha) e a segunda com papel “couché” liso (brilhoso) com gramatura de 90g / m². Antes de colocar as bandejas nas gaiolas os forros foram umedecidos, com água de torneira, utilizando um borrifador caseiro.

Decorridos 24 horas as bandejas foram recolhidas e as fezes coletadas utilizando um pincel de ponta fina e acondicionadas em pote coletor estéril de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo, identificadas e posteriormente, processadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP), pertencente ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA), localizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HV-UENF).

5.2.2. Pássaros de vida livre

Os canários-da-terra, *S. flaveola*, de vida livre, que vivem em Regiões urbanas e Periurbanas em simpatria com o homem e que frequentam comedouros colocados em instalações para alimentação de pássaros de vida livre, foram capturados com armadilhas do tipo “alçapão automático para pássaros”. Os pássaros de vida livre e que vivem em descampados em regiões afastadas das cidades, foram capturados com redes de neblina ornitológicas modelo “mist net” (12 m de comprimento por 2,5 m de altura e malha 17,5 mm) e com 3 “Shalves” (prateleiras). As redes foram armadas ao amanhecer até as 10 horas e a tarde das 16 horas até o anoitecer e foram vigiadas a distância e à medida que os pássaros se prendiam as redes estes foram recolhidos imediatamente.

Estas aves foram imediatamente colocadas em gaiolas com bandejas de recolhimento de fezes forradas conforme descrito anteriormente para as aves cativas. As aves de outras espécies que se prenderam nas redes foram imediatamente soltas. Foram alocadas individualmente uma ave por gaiola com alimento (mistura de grãos próprias para pássaros) e água de fácil acesso e estas gaiolas receberam uma cobertura de tecido de algodão branco de maneira que permita a entrada de ar e luz, mas que impedia visão externa da ave, evitando que a mesma se ferisse tentando escapar, diminuindo assim o estresse do confinamento.

Decorridas 24 horas as bandejas foram recolhidas e as aves soltas, no mesmo local de captura, independentemente, da quantidade de fezes coletadas. Todo o processo de coleta, acondicionamento e transporte das amostras seguiram o mesmo processo descrito anteriormente para as aves cativas.

5.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram processadas no mesmo dia, quando isso não foi possível, estas foram armazenadas sob temperatura de refrigeração, entre 4 e 8 °C e permaneceram dentro dos tubos plásticos de 50 mL, onde foi colocado uma pequena quantidade de água de torneira para impedir o ressecamento até o processamento.

5.3.1. Contagem de Oocistos por Grama de Fezes (OoPG)

Para OoPG foi utilizado todo o conteúdo de fezes contido no frasco plástico coletor, previamente pesado, estas foram maceradas com um bastão de vidro, adicionando água de torneira aos poucos, para total dissolução das fezes, em seguida foi adicionado água até completar volume de 50 mL. A solução resultante foi filtrada em tamis com gaze dupla e transferido para dois tubos tipo Falcon de 50 mL, completando-se o volume com água até atingir os 50 mL dos tubos. Em seguida, estes tubos foram centrifugados (CENTRÍFUGA SPINLAB MOD. SL-5M) a 3000 rpm por 5 minutos. O sedimento de um dos tubos foi ressuspenso em 10 mL de solução saturada de açúcar (0,8 g / ml) e transferido para tubo tipo Falcon de 15 mL completando o volume com a solução saturada de açúcar até atingir 14 mL, seguida de nova centrifugação, em mesma centrífuga, por 10 minutos a 3000 rpm.

Com o auxílio de uma pipeta de Parteur 1000 µL foi adicionada solução saturada de açúcar até obter a formação de um menisco, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 18 x 18 mm por 5 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada e rapidamente colocada sobre uma lâmina de vidro própria de microscopia e observada ao microscópio óptico sob objetiva de 40x. O número de OoPG foi aferido multiplicando-se por 2 a contagem de todos os oocistos presentes em toda a extensão da lamínula, dividido pelo peso em grama da amostra coletada, conforme fórmula abaixo. O sedimento do outro tubo foi utilizado para esporulação e contagem qualitativa dos oocistos.

$$\text{OoPG} = 2 \times \frac{\text{número de oocistos contados}}{\text{Peso das fezes em grama}}$$

5.3.2. Esporulação

A esporulação foi feita somente com as amostras sabidamente positivas para coccídeos e para isto, se utilizou o sedimento do segundo tubo que foi centrifugado junto com o utilizado na contagem quantitativa de OoPG. O sedimento deste segundo tubo foi ressuspenso em uma solução de dicromato de potássio 2,5 % e colocado em uma placa de Petri formando uma fina camada da suspensão no fundo da placa. A cada 24 horas uma alíquota foi transferida para um tubo tipo Falcon de 10 mL, esse tubo foi completado com água destilada e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm e o

sobrenadante descartado. O sedimento do tubo foi ressuspenso em 10 mL de solução saturada de açúcar (0,8 g / mL).

Esse material foi transferido para tubo tipo Falcon de 15 mL e adicionada solução saturada de açúcar até atingir 14 mL, seguida de nova centrifugação, em mesma centrífuga, por 10 minutos a 3000 rpm. Com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL foi adicionada solução saturada de açúcar até obter a formação de um menisco, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 18 x 18mm por 5 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada e rapidamente colocada sobre uma lâmina de vidro própria de microscopia e observada ao em objetiva de 40 x. Foram contados oocistos presentes em toda a extensão da lamínula ou o limite de 100 oocistos observando o percentual dos oocistos esporulados e não esporulados. Foi considerado o processo de esporulação encerrado quando se atingiu 80 % de esporulação.

5.3.3. Morfologia e Morfometria dos Oocistos

A observação dos oocistos para a diferenciação morfológica e morfométrica foi feita conforme proposto por Duszynski e Wilber (1997) utilizando-se microscópio óptico Eclipse i80 (Nikon, Japão), equipado com contraste interferencial e em objetivas de 10 x, 40 x com ampliação, conforme conveniência. Para a captura de imagens, foi utilizada câmera digital *Coolpix 5700* (Nikon, Japão) e *software NIS Elements* auxiliou na análise morfométrica.

Os oocistos presentes nas lâminas foram então, submetidos à análise morfológica observados no oocisto: forma; característica da parede; presença de micrúpila, capuz polar, resíduo e grânulo polar. No esporocisto: resíduo e corpo de Stieda, Substieda e Parastieda. No esporozoíto: presença de corpo refrátil e núcleo.

5.3.4. Contagem Qualitativa dos Oocistos

O OoPG qualitativo foi feito utilizando toda a suspensão de oocistos esporulados contidos nas placas de Petri, para tanto, as suspensões foram transferidas, individualmente, para tubos tipo Falcon de 50 mL e centrifugado (CENTRÍFUGA SPINLAB MOD. SL-5M) a 3000 rpm por 5 minutos. O sedimento de cada tubo foi ressuspenso em 10 mL de solução saturada de açúcar (0,8 g / mL). Esse material foi homogeneizado e transferido para tubo tipo Falcon de 15 mL e

adicionada solução saturada de açúcar até atingir 14 mL, seguida de nova centrifugação, em mesma centrífuga, por 10 minutos a 3000 rpm.

Com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL foi adicionada solução saturada de açúcar até obter a formação de um menisco, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 18 x 18 mm por 5 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada e rapidamente colocada sobre uma lâmina de vidro própria para microscopia e observada ao microscópio óptico sob objetiva de 40 x. Foram contados oocistos presentes em toda a extensão da lamínula ou o limite de 100 oocistos observando o percentual dos oocistos esporulados de acordo com a diferenciação proposta por Coelho et al. (2011) e presentes no quadro 1. Foi então feita a proporção das espécies presentes considerando nas fezes de cada pássaro de acordo com o OoPG aferido de cada ave.

5.3.5. Análise molecular

Amostras fecais de seis aves de cativeiro foram submetidas à extração de DNA e nested PCR, para análise molecular onde se verificou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em microscopia de luz e confirmação pela Técnica de Ziehl Neelsen (Anexo III).

5.3.5.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen®), com algumas modificações em relação ao protocolo sugerido pelo fabricante (SANTÍN et al., 2004). Para cada alíquota de amostra (50-100 µL) foram adicionados 180 µL de Tampão ATL e 20 µL de proteinase K e, após homogeneização em um agitador vortex (Biomixer QL-901, EUA), o material era incubado a 55°C *overnight*. Após esta etapa as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex durante 15 segundos e, em seguida, foram adicionados 200 µL de Tampão AL. Cada amostra foi submetida a uma nova homogeneização e incubada a 70°C por 10 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 200 µL de etanol (96 – 100%) em cada tubo de amostra, que foram homogeneizados e o conteúdo transferido para uma coluna DNeasy Mini spin, colocada em tubo de 2 mL. Cada coluna foi centrifugada a 6000g (8000 rpm) por um minuto e logo após todo o conteúdo do tubo de 2 mL foi descartado. As colunas DNeasy Mini spin foram então colocadas em um novo tubo de

2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW1, e submetidas a nova centrifugação por um minuto a 6000 g (8000 rpm) e novamente descartado o conteúdo do tubo de 2 mL. Cada coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW2, e centrifugados dessa vez por três minutos a 20000 g (14000 rpm) com a finalidade de secar a membrana da coluna DNeasy. O conteúdo do tubo de 2 mL foi então descartado.

As colunas DNeasy Mini spin foram colocadas em um novo tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 100 µL de Tampão AE diretamente da membrana da coluna DNeasy com a finalidade de aumentar a concentração de DNA. Após um minuto de incubação em temperatura ambiente, foram então centrifugadas por um minuto a 6000 g (8000 rpm) e levadas para refrigeração. Todas as centrifugações foram feitas na microcentrífuga *Eppendorf MiniSpin*[®] / Alemanha.

5.3.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Foi utilizada a técnica de nested PCR para o diagnóstico *Cryptosporidium* spp., com amplificação em duas etapas de um fragmento do gene 18S rRNA. Para reação primária com amplificação de um produto com aproximadamente 1325 pb foram utilizados os primers CRYPTOOF (5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3') e CRYPTOR (5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3'), e para reação secundária com amplificação de um produto de aproximadamente 826 pb foram utilizados os primers AL1598 (5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3') e AL3032 (5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3'), nas seguintes condições de reação: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 unidade (U) de Taq DNA polimerase, 200 micromolar (µM) de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nanomolar (nM) de cada oligonucleotídeo (primer), 5 µL de DNA alvo na reação primária e 2,5 µL de DNA na reação secundária. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94° C por 45 segundos, 45 s de anelamento a 50° C e 60 s de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 7 minutos (XIAO et al., 1999).

5.3.5.3. Eletroforese em gel de agarose

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5% e visualizado após coloração com *UniSafe Dye* (Uniscience®). No mesmo gel, foi carregado o marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®), além do controle positivo já existente no laboratório e controle negativo. Os produtos amplificados foram visualizados na fotodocumentadora (Gel Logic 200 Imaging System, EUA) e *software Carestream Molecular Imaging* após a corrida eletroforética.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número médio de oocistos observados e as medidas médias e os índices morfométricos dos oocistos foram submetidos à análise descritiva, e as médias comparadas através dos Testes T de Student para os grupos de aves de cativeiro e de vida livre. Todos os cálculos foram feitos com auxílio *Software Microsoft Excel 2013* e considerado intervalo de confiança de 95%.

Os valores observados de diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e índice morfométrico (IM) dos oocistos foram representados graficamente em histogramas de acordo com Sampaio (2002), onde a reta Y representou as frequências, enquanto que a reta X representou os intervalos de classes de medidas de oocistos. O valor do intervalo de classe foi obtido através da razão da amplitude dos valores obtidos na amostra pelo número ideal de classes que é representado pelo produto da multiplicação da raiz quarta do número total de amostras por 2,5.

A análise de regressão linear simples avaliou as medidas do dm sobre o DM de oocistos esporulados pertencentes a uma única espécie (NORTON e JOYNER, 1981). As medidas de dm foram organizadas na reta Y e as medidas de DM na reta X. Os gráficos com os resíduos, bem como os coeficientes de inclinação das retas de regressão foram obtidos através do *software Microsoft Excel*® (NORTON; JOYNER, 1981; SAMPAIO, 2002).

6. RESULTADOS

Foram examinadas fezes de 30 canários-da-terra, *S. flaveola*, criados em gaiolas em estabelecimentos comerciais e em criatórios legalizados para reprodução e destes, 26 apresentavam dimorfismo sexual, onde foi constatado 21 (70 %) machos e cinco (17 %) fêmeas, no entanto, quatro (13 %) destas aves não apresentavam dimorfismo e, portanto, não foi possível determinar o sexo (Tabela 1).

Analisou-se também fezes de 30 desta espécie de ave de vida livre (Figura 5) e destas nove (30 %) foram identificadas como machos, 14 (47 %) como fêmeas e em sete (23 %) não foi possível identificar o gênero da ave capturada (Tabela 2).

Sete canários-da-terra, *S. flaveola*, oriundos de uma loja que comercializa pássaros, apresentaram oocistos compatíveis morfologicamente a *Cryptosporidium* spp. pela técnica de centrifugo flutuação e microscopia de luz. Estes oocistos quando corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, também apresentaram característica do protozoário. Estes parasitas foram confirmados através da biologia molecular como pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* e através do sequenciamento foi constatado que todos os pássaros estavam infectados com *Cryptosporidium galli* e apenas um desses pássaros também apresentava a espécie *Cryptosporidium andersoni* (ANEXO III).



Figura 5. Canários-da-terra, *Sicalis flaveola*, de vida livre capturados em Eugenopólis, estado de Minas Gerais, Brasil. Em **A**, espécime macho e em **B**, espécime fêmea. **Fonte:** (ELIZEU, 2022).

6.1. OOCISTOS POR GRAMA DE FEZES

6.1.2. Aves de cativeiro

Destas aves foi possível coletar de 2,2 a 12,55 e média de 5,48 gramas de fezes, com uma contagem total de oocistos variando de quatro a 16.886 e média de 2.660 excretados em 24 horas por aves. A contagem de OOPG variou de dois a 4.311 com média de 862 (Tabela 1).

6.1.3. Aves de Vida Livre

Das aves de vida livre mantidas por 24 horas em gaiolas foi possível coletar de um a 12 e média de 4,09 gramas de fezes. A partir destas fezes foram contados de cinco a 10.049 oocistos por ave com média de 2003 oocistos excretados. Para este grupo de aves o OOPG variou de três a 3.377 com média aferida de 985 (Tabela 2).

6.1.4. Diferença relacionada ao sexo

Não foram observadas diferenças significativas na contagem de OOPG de canário-da-terra, *S. flaveola*, em relação ao sexo das aves criadas em cativeiro e de vida livre ou quando foram analisadas as frequências de todas as aves como um único grupo, $P = 0,0967$; $0,3731$ e $0,7683$, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 1. Oocisto por Grama de Fezes (OOPG) de canários-da-terra, *Sicalis flaveola*, de cativeiro em relação ao dimorfismo sexual.

Aves	Gênero	Gramas de fezes	Contagem total	OOPG
C1	Macho	6,48	1.334	412
C2	Macho	6,80	39	11
C3	Fêmea	6,39	186	58
C4	Fêmea	3,92	4	2
C5	Fêmea	7,29	530	145
C6	Macho	3,83	2.881	1.504
C7	Macho	5,02	1.296	516
C8	Macho	3,06	146	95
C9	Macho	3,07	2.866	1.867
C10	-	6,45	5.535	1.716

C11	-	8,08	6.616	1.638
C12	-	8,81	2.210	502
C13	Macho	3,41	264	155
C14	Macho	3,36	200	119
C15	Macho	3,56	930	522
C16	Macho	3,00	1.556	1.037
C17	Macho	2,82	1.755	1.245
C18	Macho	4,39	3.026	1.379
C19	Macho	3,85	251	130
C20	-	5,17	2.224	860
C21	Macho	9,44	16.886	3.578
C22	Macho	10,42	2.001	384
C23	Macho	5,00	133	53
C24	Macho	3,50	691	395
C25	Macho	4,65	10.022	4.311
C26	Macho	12,55	15.005	2.391
C27	Macho	3,28	46	28
C28	Fêmea	4,90	34	14
C29	Macho	2,20	781	710
C30	Fêmea	9,57	348	73
MÉDIA		5,48	2.660	862

Tabela 2. Oocisto por Grama de Fezes (OOPG) de canários-da-terra *Sicalis flaveola* de vida livre em relação ao dimorfismo sexual.

Aves	Gênero	Gramas de fezes	Contagem total	OOPG
VL1	Fêmea	4,50	6	3
VL2	Fêmea	3,25	739	455
VL3	-	5,23	4.817	1.842
VL4	-	3,00	1.086	724
VL5	-	4,95	1.026	415
VL6	-	4,88	69	28
VL7	-	3,45	677	392
VL8	Fêmea	6,00	10.049	3.350
VL9	Fêmea	7,40	1.126	304
VL10	Macho	6,90	1.420	412
VL11	Macho	12,00	619	103
VL12	Fêmea	7,60	67	18
VL13	-	4,87	8.223	3.377
VL14	Fêmea	3,50	2.336	1.335
VL15	Fêmea	3,70	5	3
VL16	-	4,00	5.435	2.718
VL17	Fêmea	3,00	3.281	2.187
VL18	Fêmea	3,90	6.298	3.230
VL19	Macho	3,97	5.921	2.983
VL20	Fêmea	3,80	3.085	1.624
VL21	Fêmea	1,56	690	885
VL22	Macho	1,51	377	499
VL23	Macho	1,21	794	1.312
VL24	Fêmea	3,90	116	59
VL25	Macho	2,81	62	44
VL26	Fêmea	1,00	49	98
VL27	Macho	3,02	38	25
VL28	Macho	2,45	63	51
VL29	Fêmea	3,05	1.523	999
VL30	Macho	2,36	78	66
MÉDIA		4,09	2.003	985

Tabela 3. Oocistos por grama de fezes (OOPG) de machos e fêmeas de canários-da-terra, *Sicalis flaveola*.

Aves	n ¹	OOPG				Valor de p ²
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	
Cativeiro						
Machos	21	992	1.189	11	4.311	0,0967
Fêmeas	5	58	57	2	145	
Vida livre						
Machos	9	610	981	25	2.983	0,3731
Fêmeas	14	1.039	1.171	3	3.350	
Cativeiro e Vida livre						
Machos	30	878	1.128	11	4.311	0,7683
Fêmeas	19	781	1.090	2	3.350	

¹Número de animais.

²Teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

6.1.5. Diferença em relação a origem das aves

Não foi observada diferença significativa nas contagens de OOPG ($P=0,6689$) de canário-da-terra, *S. flaveola*, quanto a origem das aves se de cativeiro ou de vida livre (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de oocistos por grama de fezes (OOPG) em relação a origem de Canários-da-terra, *Sicalis flaveola*.

Aves	n ¹	OOPG				Valor de p ²
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	
Cativeiro	30	862	1054	2	4311	0,6689
Vida livre	30	985	1125	3	3377	

¹Número de animais.

²Teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

6.2. FREQUÊNCIA

Em 14 aves foram feitas análise morfológica de 514 oocistos presentes nas fezes das aves de cativeiro e vida livre. Foram identificadas duas espécies de *Isospora* já relatadas com prevalência de 9 % para *I. sicalisi* e 47 % para *I. cetasiensis* e 7 % para uma nova espécie denominada *Isospora bertoi*. Foi observado também 37 % de oocistos do gênero *Eimeria*, também sem relato na literatura e aqui denominada *Eimeria flaveola*. (Tabela 5).

6.2.1. *Isospora sicalisi*

Foram identificados oocistos de *I. sicalisi* com prevalência de 32 % nas aves de cativeiro e 1 % nas de vida livre. Nas aves de vida livre observou-se 2 % de oocistos com grânulo polar, característica morfológica ainda não relatada para a espécie (Tabela 5).

6.2.2. *Isospora cetasiensis*

Foram diagnosticados oocistos de *I. cetasiensis* com prevalência de 68 % nas aves de cativeiro e 39 % nas de vida livre. Nas aves de vida livre observou-se 2 % de oocistos com grânulo polar, característica morfológica ainda não relatada para a espécie (Tabela 5).

6.2.3. *Isospora bertoi* (Descrição no anexo I)

Foram diagnosticados oocistos de *I. bertoi* n. sp. com prevalência de 9 % nas aves de vida livre. (Tabela 5).

6.2.4. *Eimeria flaveola* (Descrição no anexo II)

Foram diagnosticados oocistos de *E. flaveola* n. sp. com prevalência de 48 % nas aves de vida livre. (Tabela 5).

6.2.5. *Cryptosporidium* spp. (Descrição no anexo III)

Das sete aves que apresentaram oocistos característico de *Cryptosporidium* spp., somente pôde ser confirmado através da PCR (Figura 6) o gênero em seis destes, visto que um dos pássaros foi vendido e não foi possível novas coletas para a confirmação através da biologia molecular. Assim consideramos a frequência de 100% dos pássaros desta loja como positivas para o parasita em pauta.

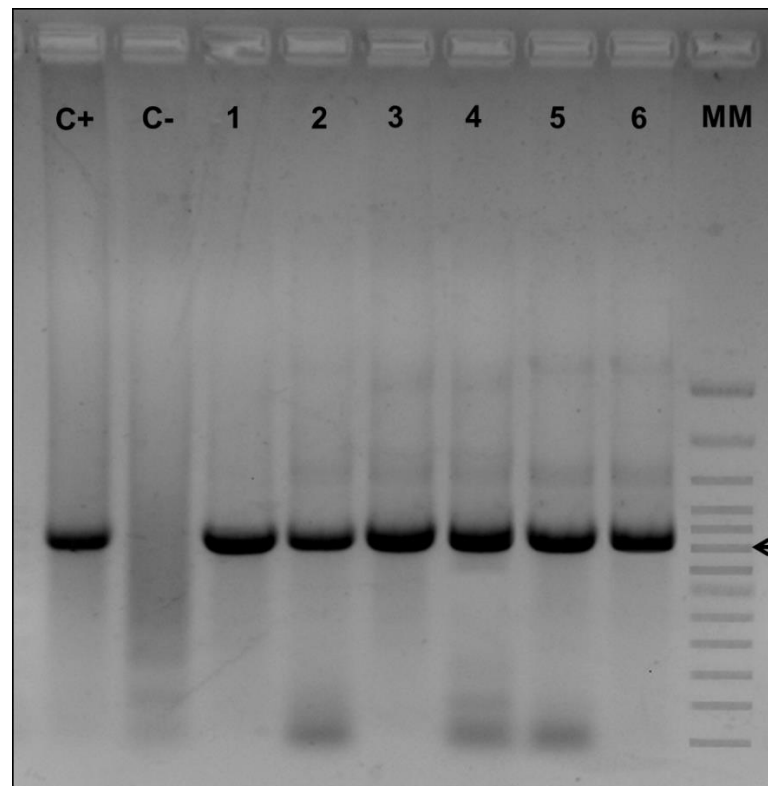


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1 %) com os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium*. Controle positivo (C+); controle negativo (C-), amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 positivas e Marcador de peso molecular (MM). A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb.

Tabela 5. Frequência de oocistos encontrados em canários-da-terra *Sicalis flaveola* de cativo e vida livre.

AVES	n ¹	OOCISTOS					
		<i>Isospora sicalisi</i>		<i>Isospora cetasiensis</i>		<i>Isospora bertoi</i>	<i>Eimeria flaveola</i>
		sem GP ²	com GP	sem GP	com GP	nova espécie	nova espécie
Cativeiro							
1	22	100%	0%	0%	0%	0%	0%
6	18	28%	0%	72%	0%	0%	0%
11	18	17%	0%	83%	0%	0%	0%
12	16	38%	0%	62%	0%	0%	0%
18	16	6%	0%	94%	0%	0%	0%
21	15	0%	0%	100%	0%	0%	0%
26	15	7%	0%	93%	0%	0%	0%
TOTAL	120	32%	0%	68%	0%	0%	0%
Vida Livre							
3	13	0%	8%	92%	0%	0%	0%
8	22	0%	0%	100%	0%	0%	0%
13	58	0%	0%	97%	3%	4%	0%
17	22	14%	27%	36%	23%	0%	0%
20	223	0%	0%	0%	0%	12%	72%
21	13	0%	0%	100%	0%	0%	12%
29	43	0%	0%	100%	0%	0%	0%
TOTAL	394	1%	2%	39%	2%	9%	48%
TOTAL GERAL	514	8%	1%	46%	1%	7%	37%

¹Número de oocistos.²Grânulo polar.

6.3. MORFOMETRIA

6.3.1. *Sicalis flaveola* de cativeiro

Para as aves de cativeiro foi possível aferir os dados morfométricos de oocistos esporulados, esporocistos, corpo de Stieda e Substieda. Estes dados podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de espécies de *Isospora* isoladas em fezes de canário-da-terra *Sicalis flaveola* de cativeiro.

MEDIDAS	CATIVEIRO			
	n ¹	<i>Isospora sicalisi</i>	N	<i>Isospora cetasiensis</i>
Oocisto				
Diâmetro maior	25	26,84±2,38 (23,21-32,68)	99	22,37±1,44 (19,04-27,72)
Diâmetro menor	25	25,08±2,41 (21,34-31,38)	99	21,20±1,36 (18,7-24,88)
Índice morfométrico	25	1,07±0,06 (1,00-1,24)	99	1,06±0,05 (1,00-1,39)
Parede	25	1,19±0,20 (0,84-1,56)	54	1,04±0,11(0,80-1,44)
Esporocisto				
Diâmetro maior	42	17,54±1,40 (15,23-21,57)	136	15,63±1,13 (11,07-18,73)
Diâmetro menor	42	12,14±1,20 (10,41-16,56)	136	10,80±0,80 (9,05-14,44)
Corpo de Stieda				
Largura	34	2,15±0,53 (1,22-4,38)	57	2,04±0,37 (1,34-2,96)
Altura	34	1,11±0,35 (0,45-2,68)	57	0,94±0,20 (0,60-1,54)
Corpo de Substieda				
Largura	32	4,54±0,72 (2,37-5,88)	24	2,93±0,97 (2,10-6,23)
Altura	32	2,73±0,46 (1,09-3,48)	24	1,77±0,67 (1,03-3,88)

¹Número de oocistos mensurados.

6.3.2. *Sicalis flaveola* de Vida livre

Para as aves capturadas de vida livre foi possível observar alguns oocistos com a presença de grânulo polar em *I. sicalisi* e *I. cetasiensis*. Esta característica morfológica foi também observada em *I. bertoi* n sp.. Os dados morfométricos de oocistos esporulados, esporocistos, corpo de Stieda e Substieda e grânulo polar das três espécies de *Isospora* isoladas em fezes de canário-da-terra, de vida livre podem ser visualizados nas Tabela 7. Os mesmos dados morfométricos observado em

Isoospora exceto corpo de Substieda, além das medidas de resíduo do esporocisto, esporozoíta, núcleo e corpo refrátil referentes a *E. flaveola* n sp. estão descritas na Tabela 8.

6.3.3. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de *Isoospora sicalisi*

Oocistos de *I. sicalisi*, apresentaram maior frequência e conseqüentemente uma maior tendência a terem suas dimensões entre 25 a 26 µm de diâmetro maior e 23 a 25 µm de diâmetro menor (Figura 7a, b) e índice morfométrico entre 1,0 e 1,1 mostrando uma alta tendência de os oocistos desta espécie possuírem forma esférica a subesférica (Figura 7c).

6.3.4. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de *Isoospora sicalisi*

Foi verificado que na regressão linear simples os pontos apresentaram-se próximos da reta com valor de R^2 maior que 0,5, caracterizando que os oocistos morfologicamente semelhantes a *I. sicalisi*, apresentam também semelhanças morfométricas, confirmando o diagnóstico da espécie (Figura 8).

Tabela 7. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de espécies de *Isoospora* isoladas em fezes de canário-da-terra *Sicalis flaveola* de vida livre.

MEDIDAS	VIDA LIVRE									
	<i>Isoospora sicalisi</i>				<i>Isoospora cetasiensis</i>				<i>Isoospora bertoi</i>	
	n ¹	Sem GP ²	N	Com GP	n	Sem GP	N	Com GP	n	nova espécie
Oocisto										
Diâmetro maior	2	26,21±0,97 (25,24-27,18)	6	26,44±0,67 (25,31-27,40)	75	22,59±1,48 (18,66-26,58)	7	21,48±1,51 (19,23-23,45)	32	23,61±1,20 (21,14-26,54)
Diâmetro menor	2	24,50±2,53 (21,97-27,03)	6	24,14±0,72 (22,79-25,22)	75	21,29±1,62 (17,80-25,33)	7	20,90±1,36 (18,66-22,70)	32	22,04±1,24 (19,41-24,56)
Índice morfométrico	2	1,08±0,07 (1,01-1,15)	6	1,10±0,05 (1,00-1,17)	75	1,06±0,05 (1,0-1,26)	7	1,03±0,02 (1,00-1,06)	32	1,07±0,05 (1,00-1,20)
Parede	-	-	1	0,96	17	1,19±0,13 (0,92-1,39)	3	1,29±0,07 (1,2-1,36)	18	1,12±0,10 (0,92-1,29)
Esporocisto										
Diâmetro maior	4	17,59±0,77 (16,32-18,29)	9	16,48±0,81 (15,23-17,76)	116	15,01±1,07 (10,42-17,92)	8	15,12±0,86 (13,85-16,52)	37	16,17±1,25 (13,61-17,86)
Diâmetro menor	4	11,50±0,65 (10,92-12,53)	9	11,63±0,74 (10,55-13,16)	116	10,58±0,73 (9,08-13,68)	8	10,30±0,58 (9,60-11,32)	37	10,07±0,71 (8,94-12,43)
Corpo de Stieda										
Largura	1	1,99	3	2,30±0,66 (1,61-3,19)	13	2,23±0,39 (1,49-2,9)	1	2,70	-	-
Altura	1	0,93	3	0,93±0,22 (0,61-1,1)	13	0,88±0,11 (0,6-1,03)	1	1,17	-	-
Corpo de Substieda										
Largura	1	3,46	2	4,17±0,87 (3,30-5,04)	6	2,83±0,28 (2,35-3,18)	1	3,00	-	-
Altura	1	1,93	2	2,34±0,43 (1,91-2,76)	6	1,56±0,10 (1,39-1,68)	1	1,62	-	-
Grânulo Polar										
Diâmetro maior	-	-	2	3,64±1,32 (2,32-4,95)	-	-	3	2,55±0,22 (2,18-2,74)	24	2,96±0,59 (1,90-4,06)
Diâmetro menor	-	-	2	1,87±1,02 (0,85-2,89)	-	-	3	2,00±0,49 (1,36-2,73)	24	2,23±0,63 (1,12-3,64)

¹Número de oocistos mensurados

²Grânulo polar

Tabela 8. Morfometria em micrômetros de oocistos esporulados de *Eimeria flaveola* n sp. isoladas em fezes de canário-da-terra *Sicalis flaveola* de vida livre.

Medidas	n¹	<i>Eimeria flaveola</i> n. sp.
Oocisto		
Diâmetro maior	150	22,67±1,57 (18,47-26,48)
Diâmetro menor	150	21,19±1,42 (16,69-24,91)
Índice morfométrico	150	1,07±0,05 (1,00-1,25)
Grânulo polar		
Diâmetro maior	71	2,94±0,44 (1,83-3,96)
Diâmetro menor	71	2,13±0,55 (1,20-3,68)
Esporocisto		
Diâmetro maior	104	14,24±1,71 (9,02-19,33)
Diâmetro menor	104	9,98±1,02 (6,80-12,87)
Índice morfométrico	104	1,43±0,16 (0,74-2,11)
Resíduo do esporocisto		
Diâmetro maior	04	5,98±0,66 (5,12-6,82)
Diâmetro menor	04	5,67±0,47 (5,15-6,20)
Corpo de Stieda		
Largura	3	1,40±0,26 (1,19-1,77)
Altura	3	0,59±0,12 (0,50-0,76)
Esporozoíto		
Diâmetro maior	1	11,53
Diâmetro menor	1	2,84
Núcleo		
Diâmetro maior	1	2,04
Diâmetro menor	1	1,91
Corpo refrátil		
Diâmetro maior	2	3,66±0,50 (3,16-4,15)
Diâmetro menor	2	3,14±0,72 (2,42-3,85)

¹Número de oocistos mensurados

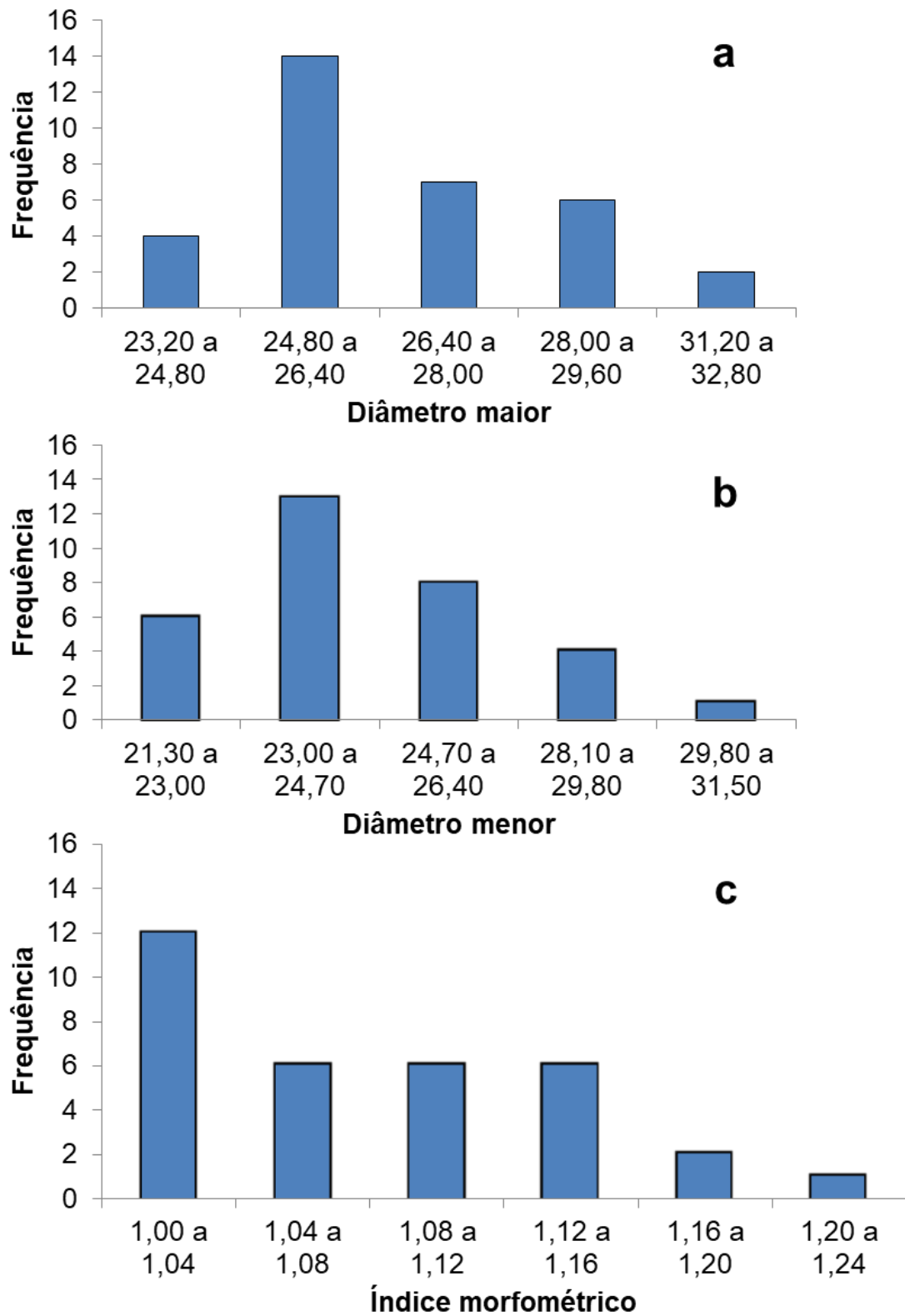


Figura 7. Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora sicalisi*: diâmetro maior (a), diâmetro menor (b) e índice morfométrico (c).

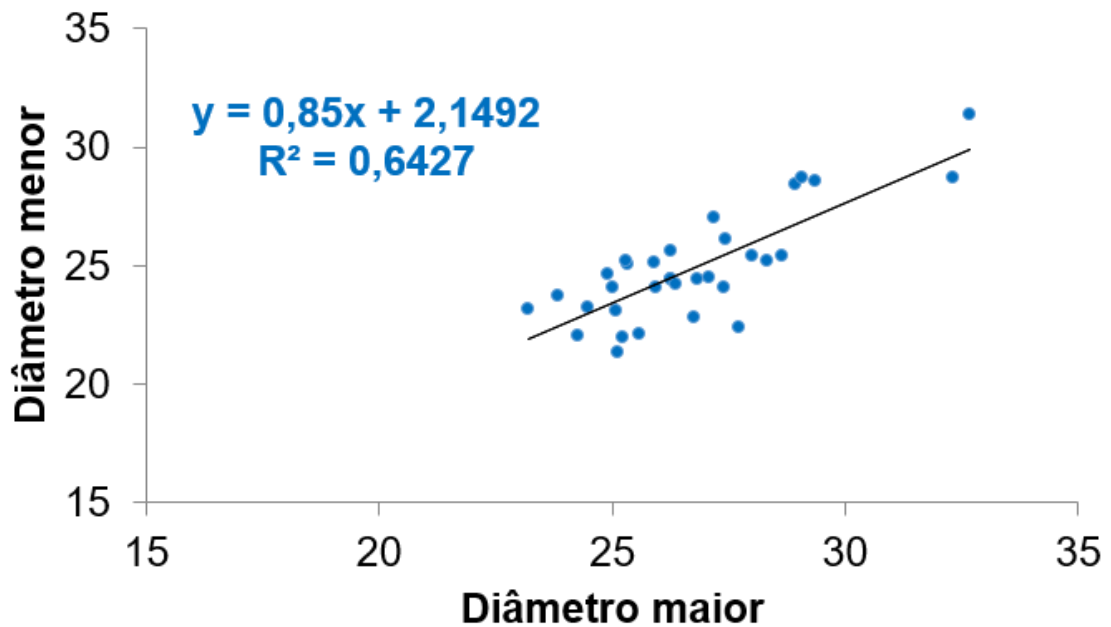


Figura 8. Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora sicalisi*.

6.3.5. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*

Oocistos de *I. cetasiensis*, apresentam maior frequência e conseqüentemente maior tendência a possuírem 21 a 23 μm de diâmetro maior e 20 a 22 μm de diâmetro menor (Figura 9a, b). No histograma de índice morfométrico, observa-se que a maioria dos oocistos estão inseridos entre os valores de 1,0 a 1,1 o que caracteriza a tendência de os oocistos terem a forma esférica a subsférica (Figura 9c).

6.3.6. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*

Os oocistos de *I. cetasiensis* possuíram certa proporcionalidade entre as dimensões de diâmetro maior e menor, uma vez que, a regressão linear resultou em um valor de R^2 acima de 0,5 (Figura 10).

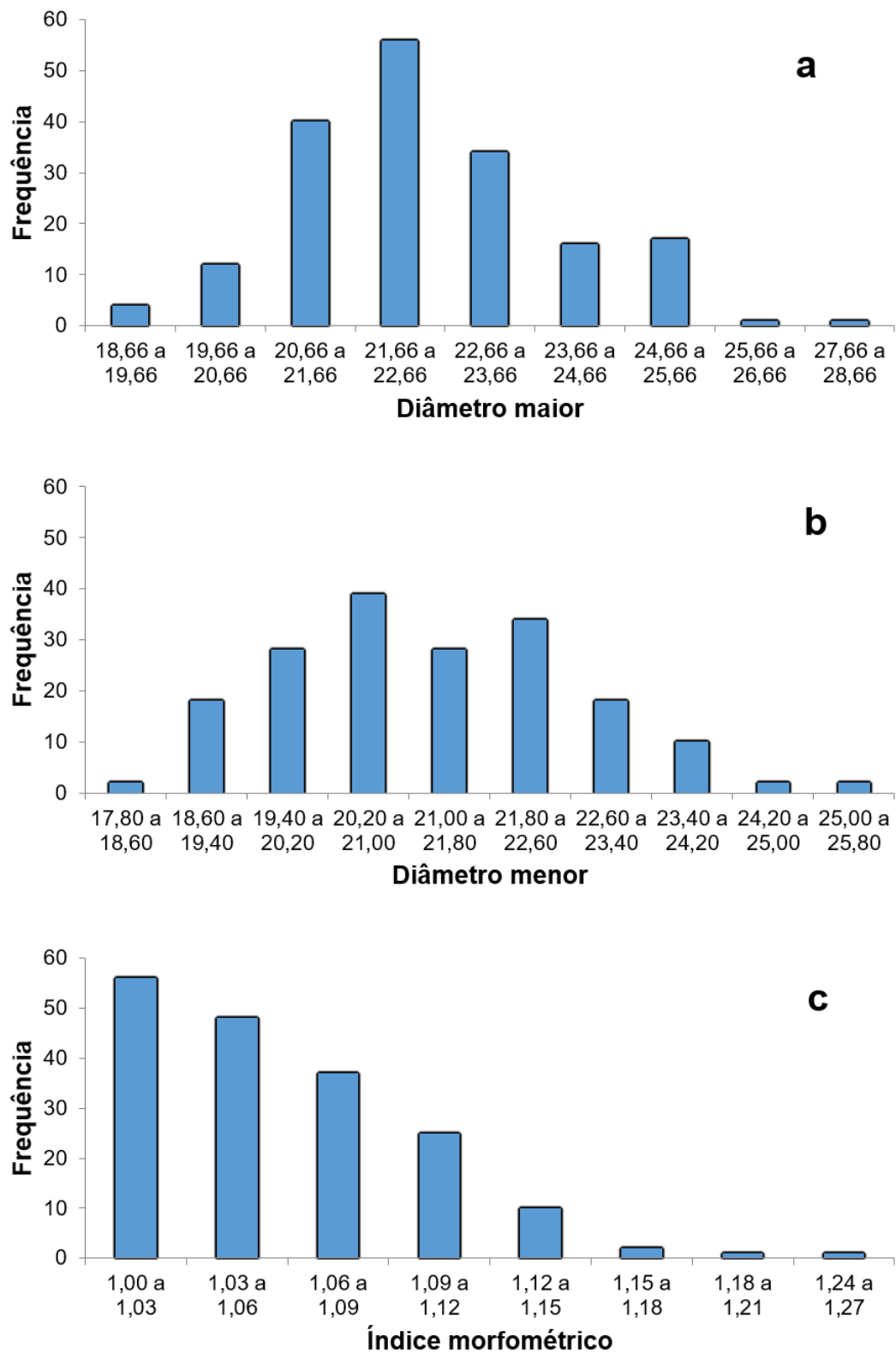


Figura 9. Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*: diâmetro maior (a), diâmetro menor (b) e índice morfométrico (c).

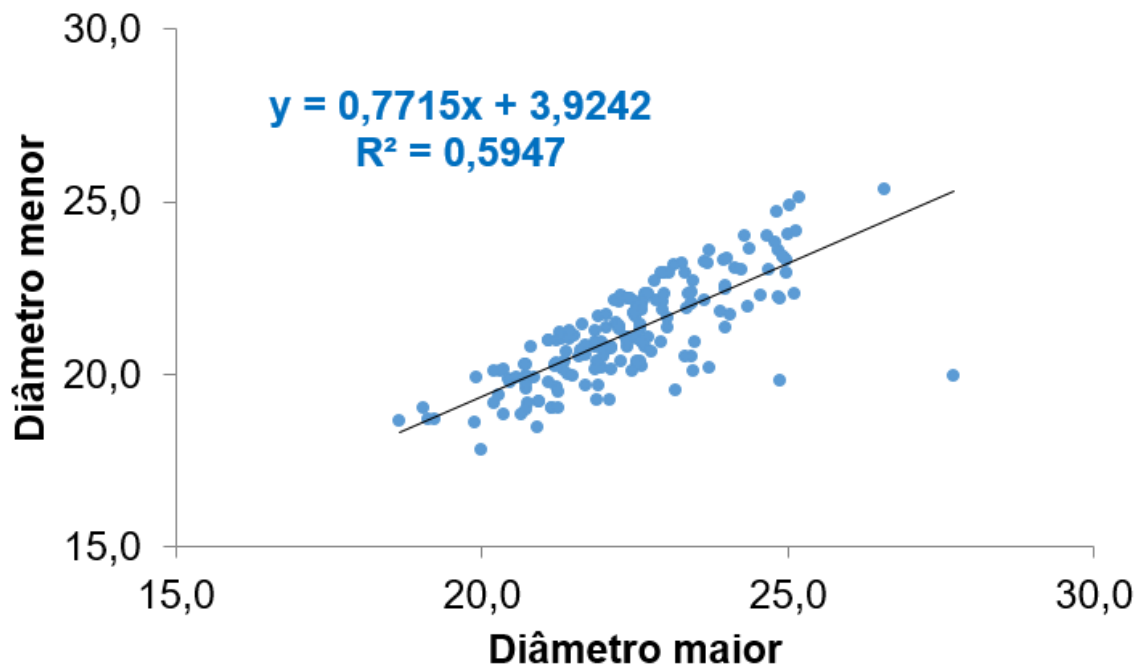


Figura 10. Regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis*.

6.3.7. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de *Isospora bertoii*

Analisando a Figura 11 que se refere aos histogramas das mensurações dos oocistos de *Isospora bertoii* n. sp., observa-se que as frequências nas classes aumentaram e diminuíram indicando que as medidas dos oocistos estão em menor quantidade nos limites dos valores e em maior quantidade nos valores medianos e, portanto, pode ser caracterizada apenas uma espécie nos oocistos mensurados.

Para *I. bertoii* n. sp. observa-se que os oocistos apresentam maior tendência a possuírem 23,8 a 24,7 μm de DM e 22 a 23 μm de dm (Figura 11a, b), uma vez que se obteve maior frequência de oocistos nestas classes de valores. No histograma de IM (Figura 11c) nota-se que as frequências são maiores nas três primeiras classes de valores inferiores e diminuem consideravelmente nas classes de valores superiores. Este resultado sustenta a alta tendência de os oocistos dessa espécie possuírem forma esférica a subsférica, ou seja, IM entre 1,0 a 1,1.

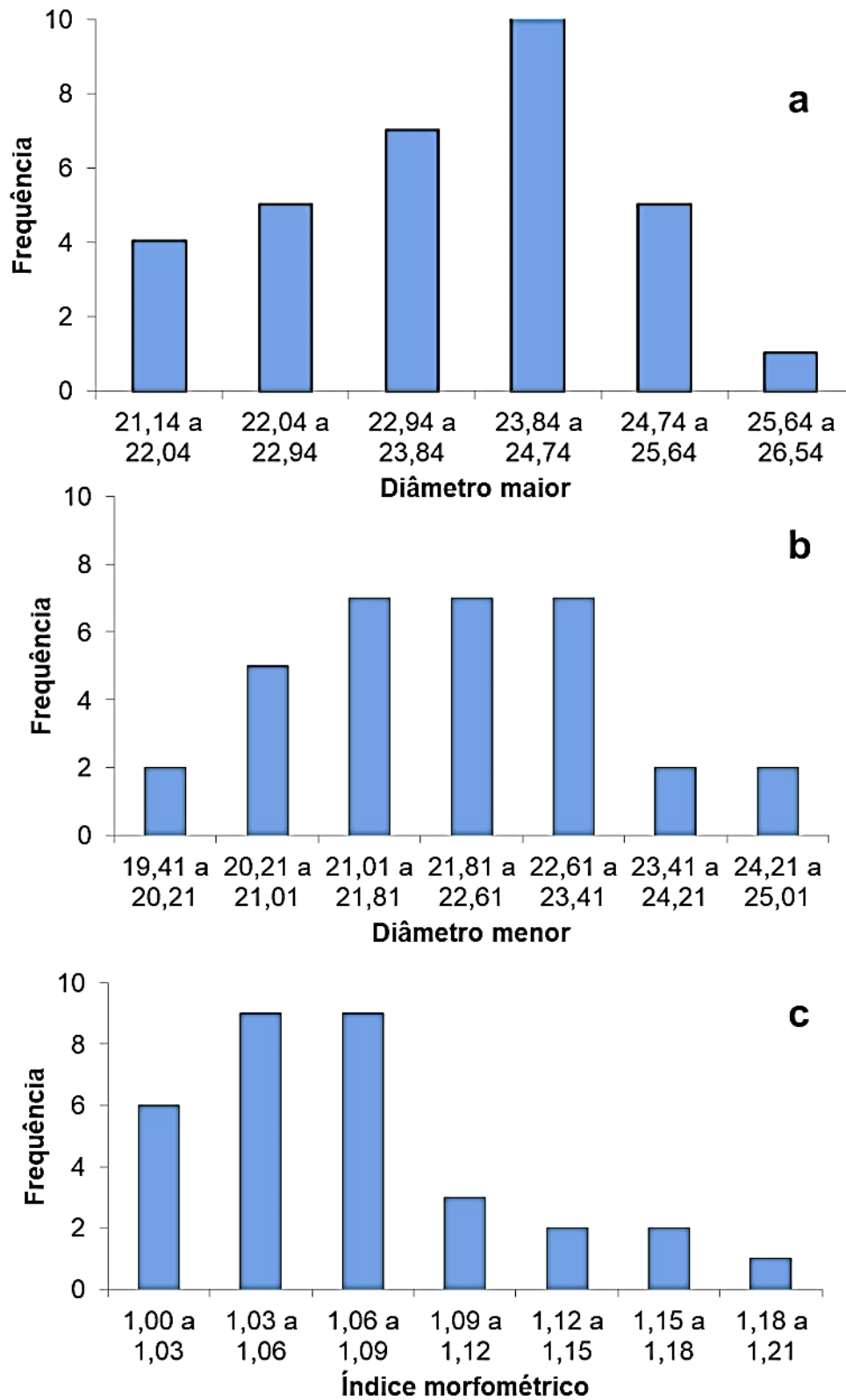


Figura 11. Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora bertoi* n. sp.: (a) Diâmetro maior, (b) Diâmetro menor e (c) Índice morfométrico.

6.3.8. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora bertoi*

Na regressão linear das dimensões dos oocistos de *I. bertoi* n. sp. obteve-se valor de R^2 próximo de 0,5 (Figura 12). Neste sentido, pode-se afirmar que a espécie não é polimórfica, porém houve algumas variações de dm sobre DM que impossibilitaram estabelecer um padrão para a espécie.

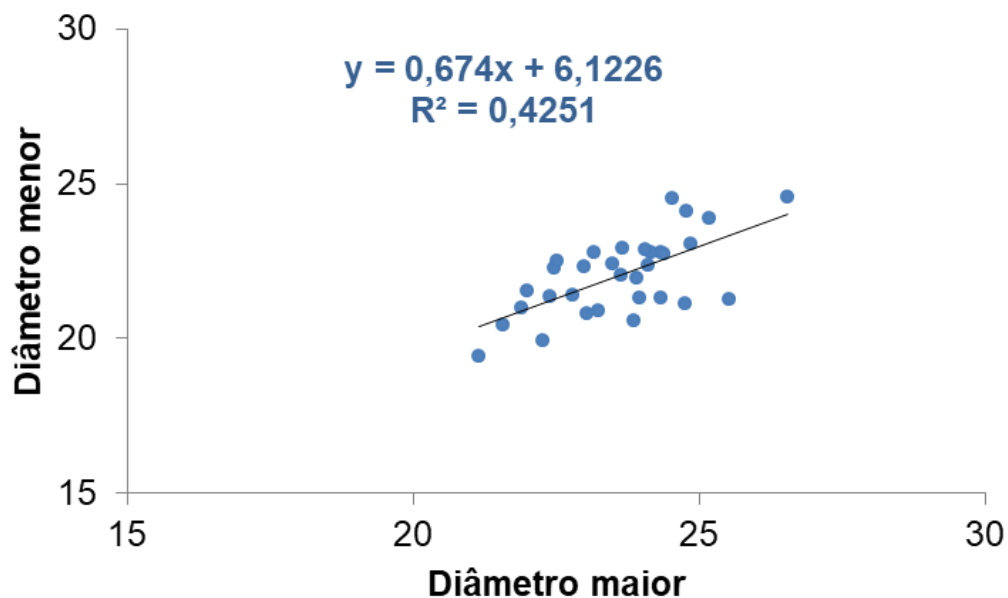


Figura 12. Regressão linear das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora bertoi* n. sp.

6.3.9. Frequência na distribuição de oocistos esporulados de *Eimeria flaveola*

Nos histogramas (Figura 13a, b) de diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (dm), observa-se que os oocistos possuem maior frequência entre os valores de 22,5 a 23,5 μm de DM e 20,7 a 21,7 μm de dm e no histograma (Figura 13c) de índice morfométrico maioria dos oocistos estão inseridos entre os valores de 1,0 a 1,1.

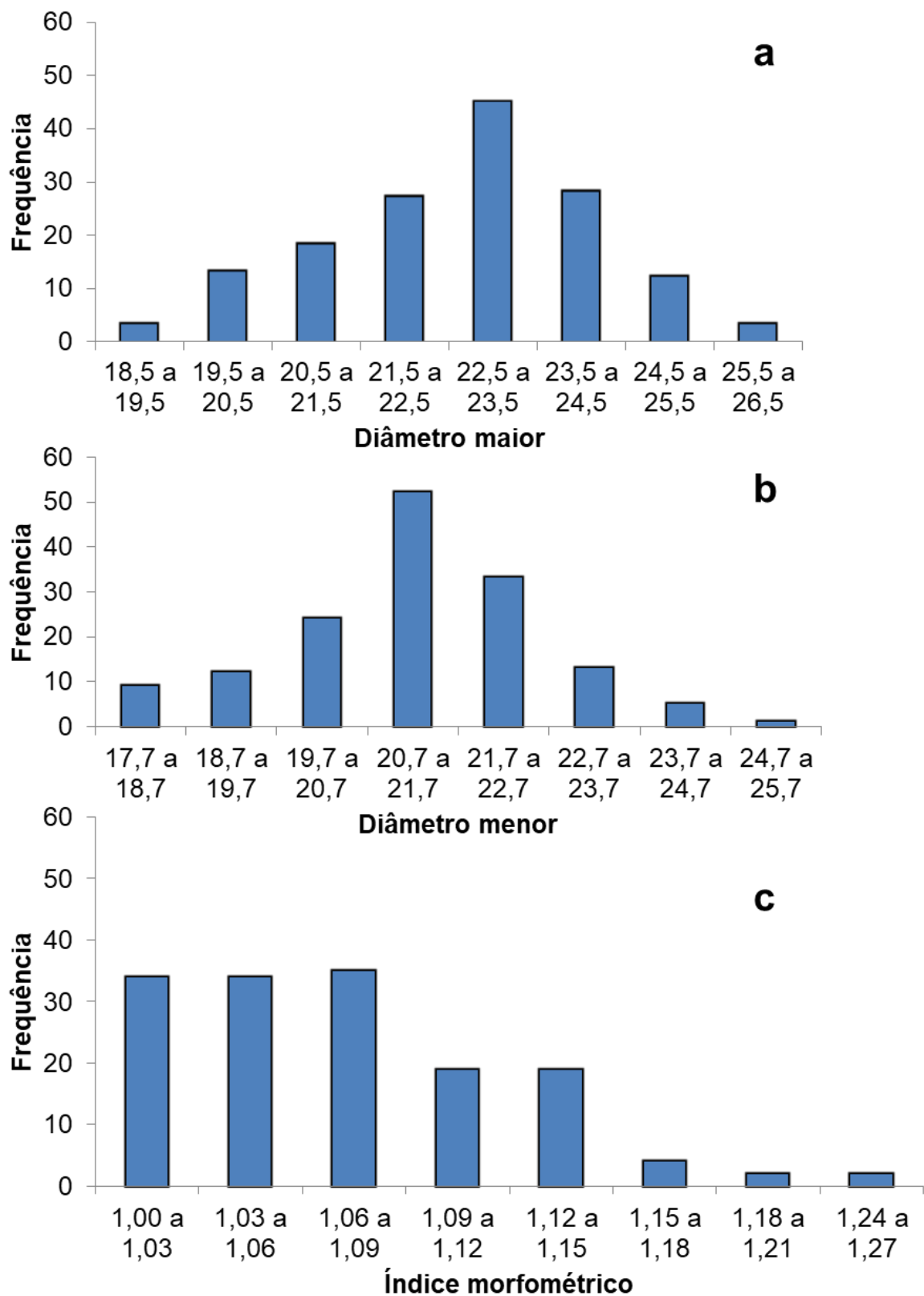


Figura 13. Histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *Eimeria flaveola* n. sp.: (a) Diâmetro maior, (b) diâmetro menor e (c) Índice morfométrico.

6.3.10. Distribuição das dimensões dos oocistos esporulados de *Eimeria flaveola*

A regressão linear das dimensões dos oocistos esporulados de *Eimeria flaveola* n. sp. pode ser visto na Figura 14.

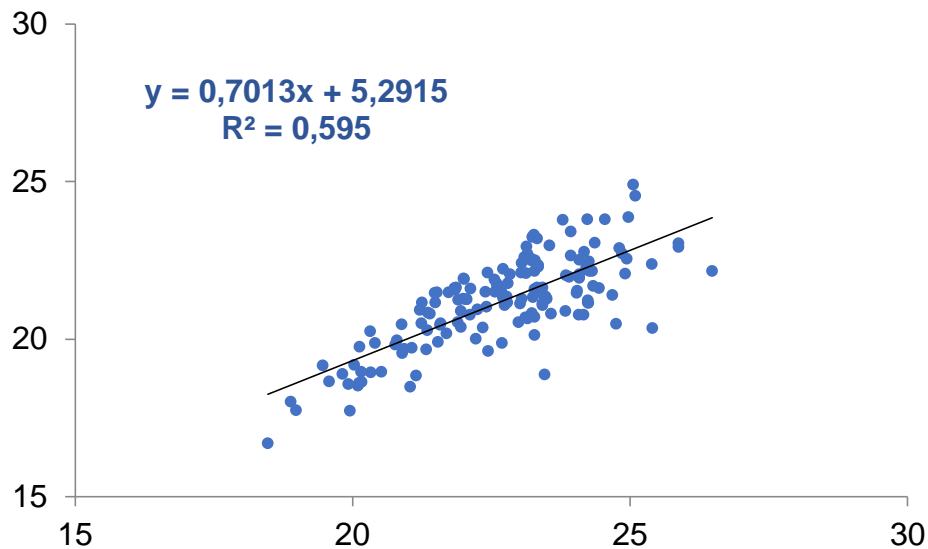


Figura 14. Regressão linear das dimensões dos oocistos esporulados de *Eimeria flaveola* n. sp.

6.4 MORFOLOGIA

Os oocistos esporulados da espécie *I. sicalisi* encontrados no presente estudo foram caracterizados como subesférico à elipsóide, parede lisa e dupla. Micrópila e resíduo do oocisto estão ausentes. Grânulo polar ausente na maior parte dos oocistos (Figura 15a, b), mas em alguns oocistos de aves de vida livre, foi observado a presença de grânulo polar elipsoidal (Figura 15c, d). Esporocistos são elipsoidais. Corpo de Stieda possui formato tipo botão e corpo de Substieda é trapezoidal. Resíduo do esporocisto é composto de grânulos esféricos espalhados e de diferentes tamanhos. Esporozoítas são vermiformes com um corpo refrátil e um núcleo.

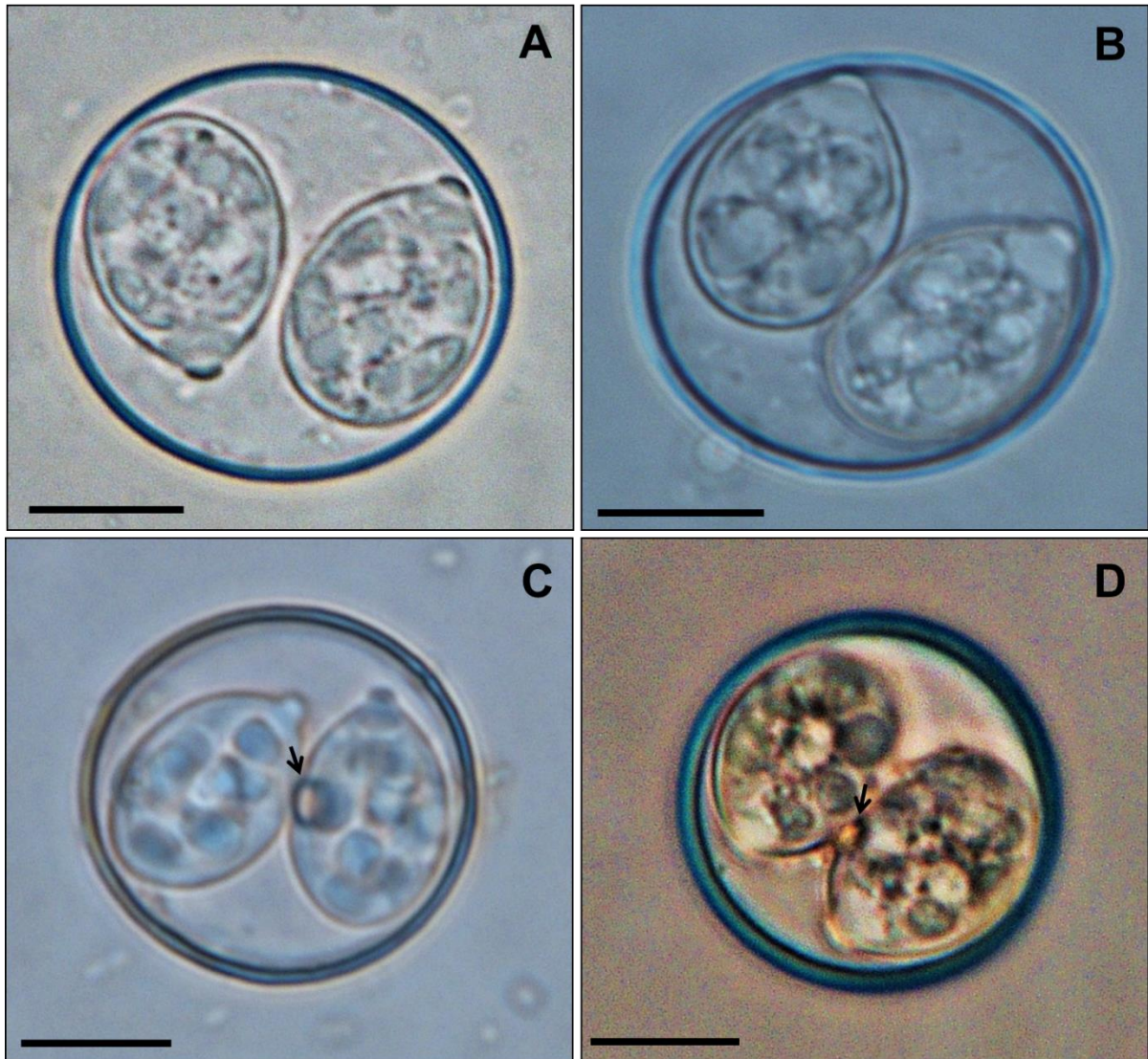


Figura 15. Micrografia ótica de oocistos esporulados de *Isospora sicalisi* sem grânulo polar (A e B) isolados de fezes de canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, de cativo e vida livre e com grânulo polar (C e D) isolados de fezes de *S. flaveola* de vida livre. Seta indica o grânulo polar. Barra: 10 μ m.

Os oocistos esporulados da espécie *I. cetasiensis* também possuem formato subsférico a elipsoidal, parede lisa e dupla. Micrópila e resíduo do oocisto estão ausentes. Assim como na espécie descrita anteriormente, o grânulo polar está ausente na maioria dos oocistos (Figura 16a, b), mas foi visualizado um grânulo polar subsférico à elipsoidal em alguns oocistos isolados das fezes de aves de vida livre (Figura 16c, d). Esporocistos são ovoides. Corpo de Stieda possui formato tipo botão e corpo de Substieda é arredondado. Resíduo do esporocisto é composto de muitos

grânulos arredondados e dispersos de variados tamanhos. Esporozoítas são vermiformes com um corpo refrátil e um núcleo.



Figura 16. Micrografia ótica de oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis* sem grânulo polar (A e B) isolados de fezes de canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, de cativeiro e vida livre e com grânulo polar (C e D) isolados de fezes de *S. flaveola* de vida livre. Seta indica o grânulo polar. Barra: 10 μ m.

7. DISCUSSÃO

O diagnóstico de coccidiose através da dimensão e morfologia dos oocistos requer treinamento, além de ser uma técnica demorada. Para Dolnik et al., (2010), a avaliação de fezes para evidência de parasitas em pequenas aves é um desafio, por isso, no presente estudo, os coccídios foram diagnosticados e comparados em detalhes com espécies de coccídeos já relatados em *Sicalis flaveola*, visto que há poucos estudos relacionados a coccídios nesse pássaro. Além da comparação com as duas espécies já existentes de coccídeos nessa ave, outras comparações foram realizadas com os parasitas de aves passeriformes do Novo Mundo também pertencentes à família Emberizidae, já que, segundo Berto et al. (2009), existe maior probabilidade de transmissão de coccídios entre aves simpátricas.

Em relação ao sexo das aves, não foram observadas diferenças significativas na contagem de OOPG de canário-da-terra, ao analisar sua relação com o dimorfismo sexual, tanto em cativeiro (Tabela 1), quanto de vida livre (Tabela 2), ou mesmo quando foram analisadas as frequências de todas as aves em um único grupo ou isoladamente (Tabela 3). Resultados que podem ser comprovados através dos estudos realizados por Brown et al (2010), os quais concluíram também que a prevalência geral da infecção não parece ser influenciada pelo sexo do hospedeiro, uma vez que a infecção é significativamente afetada pelo contato direto com as fezes, tipo de alimentação, uso de parasiticidas, tipo de recinto e a frequência que ocorre a limpeza das gaiolas. Já em pássaros de vida livre, a infecção pode ser influenciada pela perda de habitats naturais, acúmulo de populações, apreensões ilegais, disponibilidade de alimentos e abrigo (IUCN, 2002; FRIEND e FRANSON, 1999).

Além disso, no presente estudo, também não foram observadas diferenças significativas nas contagens de OOPG ($P=0,6689$) de canário-da-terra, *S. flaveola*, quanto a origem das aves, se de cativeiro ou de vida livre (Tabela 4). Pesquisas realizadas por Costas et al. (2010) também demonstraram que os animais de vida livre e de cativeiro possuem comumente coccídeos, não relatando uma prevalência significativa entre ambos. Outros autores, como Quiroga et al. (2000) e Mcquistion (2000), relatam que os passeriformes de cativeiro e de vida livre podem ser infectados por coccídios independentemente de sua origem. Porém, mesmo não apresentando uma diferença significativa em relação a origem, é fundamental conhecer o impacto

sobre as infecções causadas em aves de vida livre, pois a morfologia dos oocistos dessas aves ainda é pouco conhecida (GREINER, 2008).

O pássaro *Sicalis flaveola* de cativeiro possui duas espécies de coccídeos já descritas na literatura por Coelho et al. (2011), que são; *Isospora sicalisi* e *Isospora cetasiensis*. No trabalho de 2011 desses autores, foram capturados 26 pássaros, em que 69 % (18 aves de 26) dos animais apresentavam *I. cetasiensis* e 12 % (3 aves de 26) apresentavam *I. sicalisi*, tendo, assim, uma maior prevalência de *I. cetasiensis* nos pássaros. O presente trabalho realizou o estudo com 30 aves de cativeiro, que apresentaram também uma maior prevalência para *I. cetasiensis* com 68 % e *I. sicalisi* com 32 % (Tabela 5), comprovando que a espécie *I. cetasiensis* é comumente mais encontrada do que a *I. sicalisi* em canário-da-terra de cativeiro.

Essas espécies, já descritas na literatura, também foram encontradas nas 30 aves de vida livre mencionadas nesse trabalho, as quais representaram 39 % para *I. cetasiensis* e 1 % para *I. sicalisi* (Tabela 5), mostrando, também, que há uma maior prevalência de *I. cetasiensis* em relação *I. sicalisi* em animais de vida livre. Desse modo, houve a comparação de medidas morfométricas (diâmetro maior, diâmetro menor do oocisto e esporocisto, largura e altura do Corpo Stieda e Corpo Substieda) das espécies aqui citadas, com as medidas descritas por Coelho et al. (2011). Tais dados apresentaram semelhança, comprovando, realmente, a existência, em canário-da-terra de cativeiro (Tabela 6), das duas espécies já mencionadas. Além das espécies mencionadas, foram encontradas espécies semelhantes a essas, mas com uma característica diferente, presença de grânulo polar, visto que essas peculiaridades não foram descritas por Coelho et al. (2011). Desse modo, não foi possível determinar se tais características são um diferencial das espécies já descritas ou uma variação fenotípica (Tabela 5; Figura 15 e 16).

Outras duas novas espécies foram encontradas, nomeadas de *Isospora bertoi* e *Eimeria flaveola*. A *Isospora bertoi* apresentou 9 % de oocistos (Tabela 5) nas amostras, apresentando morfologia e morfometria diferente das outras já descritas por Coelho et al. (2011), além de outras espécies de coccídios em diferentes famílias da ordem passeriformes do Novo Mundo (*E. hochatownensis*, *E. atlapetesi*, *E. divinolimai*, *E. sicki*). As diferenças nas características morfológicas desse coccídio foram significativas o suficiente para atribuí-las como uma nova espécie. Desta forma, é possível afirmar que um padrão pode ser estabelecido para ela.

As descrições do gênero *Eimeria* na ordem Passeriformes são escassas. De acordo com (DUSZYNSKI et al., 1997), uma nova espécie de coccídio precisa ser comparada em detalhes com espécies de coccídios que possuam características similares e pertençam a mesma família do hospedeiro, por isso, a espécie encontrada de *Eimeria* foi comparada com 12 espécies de *Eimeria* spp. descritas na literatura, com características morfológicas e morfométricas. Destas, oito (*E. balozeti*, *E. anili*, *E. malaccae*, *E. depuytoraci*, *E. paradisaeai*, *E. saubenovae*, *E. lucknowensis*, *E. roscoviensis*), foram encontradas em aves passeriformes pertencentes a diferentes famílias encontradas no Velho Mundo, sendo todas elas comparadas morfológica e morfométricamente com a nova espécie encontrada, mostrando que tais espécies são diferentes da *Eimeria flaveola*. As outras quatro espécies restantes do Novo Mundo (*E. hochatownensis*, *E. atlapetesi*, *E. divinolimai* e *E. sicki*) BERTO et al., 2008; BERTO et al., 2009; SORIANO-VARGAS et al., 2015, 2017; McALLISTER e HNIDA, 2019), também serviram para a diferenciação da nova espécie. Apenas uma foi descrita na família Emberizidae, em que *S. flaveola* está inserido. Tal espécie, chamada de *Eimeria atlapetesi*, foi descrita em *Atlapetes pileatus* Wagler no México, apresentando oocistos (16,5 x 14,1 µm) e esporocistos (9,0 x 5,4 µm) elipsoides e menores dos descritos em *Eimeria flaveola* oocistos (18,47x 26,48 µm) e esporocistos (9,02x19,33) ovóides. Além disso, a espécie *E. atlapetesi* possui corpo de Stieda, que varia de achatado a formato de meia-lua, e possui corpo de Substieda, diferente da *E. flaveola*, que possui Stieda em forma de botão, ausência de Substieda (tabela 8), grânulo polar e resíduo do esporocisto. Segundo Fortes (2004), as características de uma espécie são essenciais para a identificação. Na Tabela 5, ela apresenta maior prevalência (48%) do que *Isospora bertoi*.

Além dos coccídeos de *Isospora* e *Eimeria*, encontrou-se *Cryptosporidium*, outro coccídio que está presente em aves de diversos continentes (RYAN, 2009), quatro espécies já foram descritas e 21 genótipos. Mais de 30 aves já foram diagnosticadas com algum tipo de genótipo de *Cryptosporidium* (RYAN, 2010). Além disso, um genótipo III foi sugerido como uma nova espécie nomeada de *Cryptosporidium proventriculi*.

As técnicas comuns usadas para diagnosticar infecção de *Cryptosporidium* spp. são análise microscópica e n-PCR. Conforme discutido por Nakamura et al. (2009), fazer a PCR em amostras previamente positivas pela microscopia implica em

menor custo (JEX et al., 2008). No presente trabalho, foram usadas as técnicas descritas pelos autores acima, em que foi possível observar, microscopicamente, pequenos oocistos em 7 aves cativas de uma loja que comercializava pássaros que, após coloração pela técnica de *Ziehl Neelsen*, confirmou-se diagnóstico do gênero *Cryptosporidium*. Através de PCR e sequenciamento, a espécie *Cryptosporidium galli* foi encontrada em todas as amostras, e uma das aves estava com infecção mista, sendo também detectada a espécie *Cryptosporidium andersoni*.

Dentre os resultados obtidos através da biologia molecular, a espécie de *Cryptosporidium galli* prevaleceu em 100% das amostras examinadas, (Figura 6), positividade alta, porém o número de amostras coletadas e analisadas foi baixo, dificultado a comparação de prevalência com a maioria dos estudos de *Cryptosporidium* em aves. Apenas *C. baileyi* e *C. galli*, foram identificadas em *Sicalis flaveola* em estudos anteriores. Até o momento, a co-infecção de *C. galli* e *C. andersoni* ocorreu apenas em uma das aves deste estudo, embora monas nfeccões tenham sido encontradas em *S. flaveola* em estudos anteriores com outros *Cryptosporidium* (NAKAMURA et al., 2009; SEVÁ et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014). Porém os *C. andersoni* são mais comuns em bovinos e humanos (CHALMERS e KATZER, 2013; RYAN et al., 2014), tal contaminação em *Sicalis flaveola* pode ter sido uma infecção real ou uma contaminação acidental por transporte mecânico, porém já foi relatada anteriormente na ave *Podargus strigoides* em um estudo australiano (NG et al., 2006) e em um avestruz *Struthio camelus* de um zoológico no sudoeste da França (OSMAN et al., 2017). Infecção evidencia que cuidados sanitários devem ser tomados, pois os pássaros, na loja, estavam próximos a gaiolas de outra aves e animais, o que pode ter contribuído para disseminação do mesmo. Tais aves apresentavam sintomas como: penas arrepiadas e sujas de fezes, porém não foi possível saber qual era o agente causador, pois essas aves que foram diagnósticas com *Cryptosporidium* também apresentavam *Isospora*.

Para Berto et al. (2011b), os histogramas podem ser produzidos para identificar espécies sem diferenças morfológicas, mas com possíveis tendências morfométricas. Na Figura 7, observa-se os histogramas das dimensões dos oocistos esporulados de *I. sicalisi*. Na regressão linear, avaliando as dimensões de oocistos esporulados de *I. sicalisi*, em que o valor calculado de R^2 foi maior que 0,5 e, sendo assim, os pontos mantiveram-se próximos, como é possível observar na reta de regressão no gráfico da Figura 8. Com isso, os resultados encontrados estão em

concordância aos obtidos por Berto et al. (2011b), que afirmam que poucas variações ocorreram de dm sobre DM . O mesmo pode ser observado na regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora cetasiensis* (Figura 10).

Os oocistos e/ou esporocistos com índices de forma maiores que um devem sempre ser descritos com atenção à sua forma, segundo Berto et al., (2011b). Na Figura 9c, pode-se observar que os índices aqui encontrados ficaram todos maiores que um. No IM, de acordo com observações de (2016), a maior quantidade de valores entre 1,0 e 1,1 pode ser explicada pela forma subesférica dos oocistos.

Os oocistos de *I. cetasiensis* possuíram certa proporcionalidade entre as dimensões de diâmetro maior e menor, uma vez que a regressão linear resultou em um valor de R^2 acima de 0,5 (Figura 10). A análise de regressão linear de medidas de parcelas de largura sobre comprimento de oocistos é um método estatístico há muito estabelecido que pode ser usado para relacionar medidas de oocistos da mesma ou de diferentes espécies e hospedeiros (HAUCK e HAFEZ, 2012).

Os oocistos de *I. cetasiensis*, apresentam maior frequência e, conseqüentemente, maior tendência a possuírem 21 a 23 μm de diâmetro maior e 20 a 22 μm de diâmetro menor (Figura 9a, b). Já os oocistos de *I. bertoi* possuíram certa proporcionalidade entre as dimensões de diâmetro maior e menor (Figura 11). De acordo com Coelho et al. (2011), o oocisto de *Isospora sicalisi* possui corpo de Substieda trapezoidal, o que não foi observado no de *I. bertoi* n. sp.

Quando se atenta a Figura 12, considera-se valor de R^2 próximo de 0,5 para regressão linear das dimensões dos oocistos esporulados de *Isospora bertoi* n. sp. Nesse sentido, pode-se afirmar que a espécie não é polimórfica. Para Coelho et al. (2011), por vezes, ocorrem ligeiras variações devido ao processo de esporulação e à posição dos oocistos que são examinados ao microscópio.

As frequências nas classes aumentam e diminuem gradativamente, indicando que as medidas dos oocistos estão em menor quantidade nos limites dos valores e em maior quantidade nos valores medianos e, portanto, pode ser caracterizada apenas uma espécie nos oocistos mensurados (Figura 13a). No histograma (Figura 13c), nota-se que as frequências são maiores nas primeiras classes de valores inferiores e diminuem consideravelmente nas classes de valores superiores. De acordo com Coelho et al. (2011), esse resultado sustenta a alta tendência de os oocistos dessa espécie possuírem forma esférica a subesférica, ou seja, IM entre 1,0 a 1,1. A regressão linear das dimensões de oocistos esporulados de *Isospora*

cetasiensis possui certa proporcionalidade entre as dimensões de DM e dm, uma vez que, segundo Berto et al. (2009), a regressão linear resultou em um valor de R² acima de 0,5 (Figura 14).

8. CONCLUSÃO

As análises realizadas identificaram duas novas espécies de coccídios em *Sicalis flaveola* de vida livre na cidade de Eugenópolis, sendo elas nomeadas de *Isospora bertoi* e *Eimeria flaveola*. Além disso, se observou que o sexo e a origem das aves não têm importância quanto a frequência de coccídeos em canário-da-terra, *S. flaveola*, no entanto, há uma maior circulação qualitativa de coccídeos nas aves de vida livre, inclusive com parasitismo de pelo menos três espécies de *Isospora* e uma espécie do gênero *Eimeria*.

Estudos biológicos, morfológicos e moleculares são necessários para determinar se a presença de grânulo polar em oocistos morfológicamente semelhantes a *I. sicalisi* e *I. cetasiensis* são caracteres de variação intraespecífica ou aspectos morfológicos de diferenciação interespecíficas.

Embora com baixa frequência, o diagnóstico de *C. andersoni* em aves cativa, acende um alerta para os cuidados sanitários com que estas aves devem ser criadas uma vez que esta espécie de coccídeo é mais comum parasitando bovinos e humanos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYOSHI, D. E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1828-1832, 2003.

ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology of Eimeria species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 15, p. 58-65, 2002.

AMARAL, P e OTUTUMI, L. Prevalência da Coccidiose em Frango em uma Integração Avícola da Região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Animal da Universidade Paranaense- UNIPAR**. v.9, n°.16, p. 1759 – 1768, 2013.

ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M.V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Diseases**, v. 52, p. 702-705, 2008.

AVISITE. USDA e empresa privada desenvolvem nova solução oral contra doença aviária. Portal atualizado em 5 de agosto de 2021. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/usda-e-empresa-privada-desenvolvem-nova-solucao-oral-contradoenca-aviaria/>. Acesso em 5 de janeiro de 2022.

BALL, S. J.; PITTILO, R. M.; LONG, P. L. Intestinal and extraintestinal life e cycle of eimeriid coccidia. **Advances in Parasitology**. v. 28, n.1, p. 1-54., 1989.

BERENGUER, J. G. **Manual de Parasitologia: Morfologia e Biologia dos Parasitos de Interesse Sanitário**. Argos Editora da Unochapecó, 602 p., 2006.

BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Eimeria divinolimai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the *Rufous casiornis Casiornis rufus* Vieillot, 1816 50 (Passeriformes: Tyrannidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 33-35, 2008.

BERTO, B. P.; LUZ, H. B.; 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.

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.; LUZ, H. R.; FLAUSINO, W.; FILHO, W. L. T.; 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, n. 1, p. 798-805. 2011b.

BERTO, B. P.; LOPES, B. B.; MELINSKI, R. D.; SOUZA, A. H. N.; RIBAS, C. C.; ABREU, F. H. T.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. Coccidial dispersion across transand cis-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isospora sagittulae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from nonsympatric hosts. **Canadian Journal of Zoology**, v. 92, n. 5, p. 383-388, 2014.

BIRDLIFE, INTERNATIONAL. 2018. *Sicalis flaveola*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em :<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22723346A132162254.en>. Acesso em: 05 de dezembro de 2021.

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; HOERR, F. J.; ATLAS, A. L.; TOIVIOKINNUCAN, M. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella*: passeriformes, estrilgidae). **Avian Diseases**, v. 34, p. 1027-1030, 1990.

BROWN, M. A.; BOLA, S. J.; SNOW, K. R. Coccidian Parasites of British Wild Birds. **Journal of Natural History**, v. 44, n. 43-44, p. 2669-2691, 2010.

BUSCHINELLI, A. Contribuição ao estudo da biologia do canário da terra. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 163-166, 1971.

CASAS, M. C.; DUSZYNSKY, D. W.; ZALLES, L. M. Three new Eimerians in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) Populations from Eastern Bolivia and Southern Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 247- 251, 1995.

CHALMERS, R. M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1487-1497, 2010.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol**, n. 29, p. 237-251, 2013.

CHAPPEL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 1, p. 232-236, 1996.

CHISHOLM, H. **Coccidia**. In: The Encyclopedia Britannica: A Dictionary of Arts, Sciences, Literature and General Information. 11^o ed. Cambridge: The Encyclopedia Britannica Co, p. 615-618, 1911.

CLUBB, S. L. Cryptosporidiosis in the Gouldian finch. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 11, p. 41-42, 1997.

CLYDE, V. L.; PATTON, S. Diagnosis, treatment and control of common parasites in companion and aviary birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 5. n. 1, p. 75-84, 1996.

COBRAP, Criação de Canário-da-Terra. **Pequeno Manual**, *Sicalis flaveola*. 2008.. Disponível em <http://blog.cobrap.org.br/especies/criacao-de-canario-da-terra-90>. Última atualização em 19 de fevereiro de 2008. Acesso em: 5 de janeiro de 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.

COLNAGO, G. L. A Coccidiose como Doença Nutricional. In: **Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária**, 2.1999. Foz do Iguaçu. Anais: facta, p.35-44, 1999.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.

DARABUS, G. Experimental studies of inter and intraspecific transmission of *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis*. **Revista Romana de Medicina Veterinaria**, v. 7, p. 155-160, 1997.

DARABUS, G.; OLARIU, R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 225-228, 2003.

DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. & CHRITIE, D. A. Handbook of the Birds of the World. **Lynx**, v. 16, 2011.

De CARLI, G. A.; MOURA, H. Métodos de Coloração para Coccídeos Intestinais. In.: Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: **Atheneu**, p. 223-264, 2001.

DESSPORTES-LIVAGE, I.; DATRY, A. Infections à Microsporidies, Isospora et Sarcocystis. **EMC - Maladies Infectieuses**, v. 2, p. 178-196, 2005.

DESTRO, G. F. G; PIMENTEL, T.L.; BORGES, R.C.; BARRETO, R. Efforts to Combat Wild Animals Trafficking in Brazil. Biodiversity Enrichment in a Diverse World Biodiversity Enrichment. Chapter, v. 16, p. 421-436, 2012. **InTech**. <http://dx.doi.org/10.5772/48351>.

DOLNIK, O. 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, n. 1, p.155-160, 2006.

DOLNIK, O. V.; DOLNIK, V. R.; BAIRLEN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. **Ardea**, v. 98, n. 1, p. 97-103. 2010.

DUPONT, H. L.; CHAPPELL, C. L.; STERLING, C. R.; OKHUYSEN, P. C.; ROSE, J. B.; JAKUBOWSKI, W. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 3, p. 855-859, 1995.

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

DUSZYNSKI, D. W.; UPTON, S. J.; COUCH, L. The coccidia of Passeriformes (*Eimeria*), 1999. Disponível em: <http://eimeria.unl.edu/passers.html>. Último acesso: 15 de setembro de 2021.

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

FABER, J. E.; KOLLMANN, D.; HEISE, A.; BAUER, C.; FAILING, K.; BURGER, H. J.; ZAHNER, H. *Eimeria* Infections in Cows in the Parturiente Phase and Their Calves: Oocyst Excretion and Levels of Specific Serum and Colostrum Antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 1, p.1-17, 2002.

FAHEY, T. Cryptosporidiosis. Primary Care Update Ob/Gyns, **London**, v. 10, p. 75-80, 2003.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: The coccidian. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.

FAYER, R. Effects of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 60, n. 8, p. 2732 -2735, 1994.

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperature on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1431 - 1433, 1996.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International journal for parasitology**, v.30, n. 12, p. 1305-1322, 2000.

FERNANDEZ, S.; PAGOTTO, A. H.; FURTADO, M. M.; KATSUYAMA, A. M.; MADEIRA, A. M.; GRUBER, A. A Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection and Discrimination of the Seven *Eimeria* Species that Infect Domestic Fowl, **Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 317-325, 2003.

FERNANDO, M. A. Pathology and Pathogenicity. The Biology of the Coccidian. Baltimore: **University Park Press**, 502 p. 1982.

FERREIRA, A. F. Cuidado com a coccidiose. Noticiário Tortuga, São Paulo, v. 456, n. 48, 2008. Disponível em: <https://noticiariotortuga.com.br/wp-content/uploads/2021/06/456.pdf>.

FITZGERALD, P. R. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. **Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine**, v. 24, p.121-143, 1980.

FORTES, E. Parasitologia Veterinária. 4ª ed. São Paulo: Ícone, p. 67-69, 2004

FREITAS, M. F. L; OLIVEIRA, J. B.; CAVALCANTE, M. B; FREITAS, D. A. Ocorrencia of coccidiosis in canaries (*Serinus canarius*) being kept in private captivity in the state of Pernambuco, Brazil. Santiago. **Parasitologia. Latinoamericana**. 58: p, n. 1-2, 2003. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000100017>.

FREITAS, M. F. L.; OLIVEIRA, J. B.; CAVALCANTI, M. D. B.; LEITE, A. D.; MAGALHÃES, V. S.; OLIVEIRA, R. A.; SOBRINHO, A. E. Parasitos gastrointestinales de aves silvestres em cativeiro em el estado de Pernambuco, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, p. 50-54, 2002.

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

GALLO, S. S.M.; EDERLI, N. B.; OLIVEIRA, F. C. R. A new coccidian, *Isospora rhea* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae), from *Rhea americana* (Aves, Rheidae) from South America. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 236-238, 2014.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A. **Diagnostic Medical Parasitology**. 3 ed. Washington: ASM Press, p. 54 - 89 e 411-433, 1997.

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, n. 3, p.199-209, 2010.

GODOY, S. N. **Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito)**, p.222-251. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), Tratado de animais selvagens - Medicina Veterinária. Manole, São Paulo, 2007.

GREINER, E. C.; RITCHIE, B. W.: Parasites. In: RITCHIE, B. W., HARRISON, G. L., HARRISON, L. R. (Eds): Avian Medicine: Principles and Application. Lake Worth, FL, **Wingers Publishing**, p. 1014-1019, 1994.

HARRIS, J. R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocysts wall. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 839-849, 1999.

- HAUCK, R.; HAFEZ, H. M. Description of *Eimeria pavonina* (Coccidia) from Peafowl in Germany. **Avian Diseases**, v. 56, n. 1, p. 238-242, 2012.
- HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v.115, p. 2243 - 2251, 2016.
- HUEZA, I. M. Farmacologia das aves: o uso de medicamentos anti-inflamatórios em aves silvestres. **Ars Veterinária**. v. 24, n. 1, p. 15-24, 2008.
- IUCN. IUCN Guidelines the placement of confiscated animals. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. **IUCN**. 2002. Disponível em: Disponível em: http://www.iucnsscrg.org/policy_guidelines.html. Acesso em 12 de dezembro de 2021.
- JEX, A.R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis, and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, n. 304-317, 2008 PMID:18430539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.003>.
- KANYARI, P. W. N. Experimental Infections with Coccidiosis and Serum Antibody Quantitation in two Breeds of Goats. **Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 11-18, 1988.
- KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das aves. **Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas (FACTA)**, Campinas. p. 391-405, 2000.
- KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1423 - 1428, 1990.

LEVINE, N. D. Textbook of veterinary parasitology. Minneapolis: **Burges**, 1978. p. 236, 1978.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Ames: Iowa State University Press, 414p, 1985.

LEWTHWAITE, P.; GILL, G. V.; HART, C. A.; BEECHING, N. J. Gastrointestinal Parasites in the Immunocompromised. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 427-435, 2005.

LI, X.; PEREIRA, M. G. C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; McCOWAN, B.; ATWILL, E. R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. **Internacional Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p. 343-350, 2015.

LIMA, J. D. Coccidiose dos Ruminantes Domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p. 9-13, 2004.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Biology of Mammalian Isospora. **Parasitology Today**, v. 10, n. 6, p. 214-220, 1994.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HOERR, F. J.; SMITH, P. C. Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 180-181, 1991.

LONG, P. L.; MILLARD, B. J.; JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia veterinaria latina** v.6, p. 201-217, 1976.

LONG, P. L.; MILLARD, B. J. *Eimeria*: further studies on the immunization of young chickens kept in litter pens. **Avian Pathology**, v. 8, n. 3, p. 213-228, 1979.

LONG, P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal Protozoology**, v. 31, n. 4, p. 535-541, 1984.

LUQUETTI, B. C.; FARIA, H. N.; SILVA, B. R.; GIMENEZ, D.; CASAGRANDE, C.; LEITE, F. M.; CASTELLANI, R. S. Coccidiose Aviária e Agentes Tróficos. **Ciências Agrárias e da Saúde**, FEA, Andradina. v. 6, p. 60-67, 2006.

MACHADO, L. O. M. Experiência de repovoamento com *Sicalis flaveola brasiliensis* (Gmelin, 1789) (Passeriformes, Emberizidae) em área destinada à pecuária leiteira. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n 2, p. 193-200, 1988.

MACHADO, L. O. M, 1982. Poliginia em *Sicalis flaveola brasiliensis* (Gmelin, 1789) (Passeriformes, Emberizidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 1, 2009.

MARCONDES-MACHADO, L. C. Experiência de repovoamento com *Sicalis flaveola brasiliensis* (GMELIN, 1789) (PASSERIFORMES, EMBERIZIDAE) em área destinada à pecuária leiteira. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 5, p.193-200, 1988. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751988000200003>.

MARINHO, M.; SILVA, B. G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. V. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da Região Noroeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 288-292, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/132984>>.

MARTÍNEZ-PADILLA, J.; MILLÁN, J. Prevalence and intensity of intestinal parasitation in a wild population of nestling Eurasian kestrel *Falco tinnunculus*. **Ardeola**, v. 54, p. 109-115, 2007.

MCDUGALD, L. R.; REID, W. M. **Coccidiosis**. In Diseases of Poultry, (ed. B. W. Calnek). Ames: Iowa State University Press, pp. 929. 1995.

MCALLISTER, C. T.; HNIDA, J. A. A New *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Barn Swallow, *Hirundo rustica* (Aves: Passeriformes: Hirundinidae), in Southeastern Oklahoma: The Fourth *Eimeria* Species from New World Passeriformes. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 693-696, 2019.

- MCQUISTION, T. E. The prevalence of coccidian parasites in passerine birds of South America. **Illinois State Academy of Sciences Transactions**, v. 93, n. 3, p. 221-227, 2000.
- MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, p. 197-204, 2010.
- MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, 1733 -1751, 2000.
- MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B. L.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 289-296, 2001.
- NAKAMURA, A. A.; SIMOES, D. C.; ANTUNES, R. G.; DA SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1, p. 47-51, 2009.
- NAKAMURA, A. A.; HOMEM, C. G.; SILVA, A. M.; MEIRELES, M. V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 15205, n. 1-2, p. 7-13, 2014. PMID: 25155280. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.07.033. Epub 2014 Aug 10.
- NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.24, n. 3, p. 253-267, 2015.
- NARDI, A. R. M. *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Sporozoa), em canários de cativeiro, ***Serinus canaria* Linnaeus (Passeriformes: Fringillidae) de campeonatos de ornitologia**. Dissertação (Doutorado em biologia animal) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, 160 f, 2015.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

NORTON, C. C.; JOYNER, L. P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. **Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 269-279, 1981. PMID:7329717. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000085280>.

NOVAES, J.; MANHA, A. P. S.; FONTOLAN, L. S. B.; MADEIRA, A. M. B. N. Aspectos gerais da biologia, genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. de aves domésticas. **Revista da Biologia**, v. 6, n. 2, p. 7-11, 2011.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p.139-195, 1995.

OSMAN, M.; SAFADI, D.; BENAMROUZ-VANNESTE, S.; CIAN, A.; MORINIERE, R.; GANTOIS, N.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; GUYOT, K.; BOSC, S.; CHABÉ, M.; PETIT, T.; VISCOGLIOSI, E.; CERTAD, G. Prevalence, transmission, and host specificity of *Cryptosporidium* spp. in various animal groups from two French zoos. **Parasitology Research**, v. 116, n. 12, p. 3419-3422, 2017. PMID: 29030716. DOI: 10.1007/s00436-017-5645-1. Epub 2017 Oct 13.

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

PATTON, S. An Overview of Avian Coccidia. **Scientific Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians**, Nashville, TN, p. 47-51, 1993.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia Klinicka Mikrobiologie**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi**, v. 51, p. 103-108, 2001.

PEREIRA, D. A.; DAMIN, J.; LIMA, L. M.; ULIANO, R. W. *Isospora belli*: Aspectos Clínicos e Diagnóstico Laboratorial. **Revista Brasileira de Análise Clínica (RBAC)**, v. 41, n. 4, p. 283-286, 2009.

PEREIRA, L. Q.; CORRÊA, I. M. O.; SCHNEIDERS, G. H.; LINHARES, M. T.; ALMEIDA, D. T.; LOVATO, M. *Isospora Bocamontensis* (Protozoa: Apicomplexa) em cardeais-amarelo *Gubernatrix Cristata* (Passeriformes: Emberezidae) mantidos em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira (Wildlife Medicine)**, v. 33, n. 3, p. 384-388, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000300018>.

QUEVEDO, A.; GRUBER, A. Diagnóstico Molecular da Coccidiose. **Avicultura Industrial**, v. 10, p. 44-45, 2004.

QUIROGA, M. I.; ALEMANH, N.; VÁZQUEZ, S.; NIETO, J. M. Diagnosis of atoxoplasmosis in a canary (*Serinus canarius*) by histopathological and ultrastructural examination. **Bird Diseases**, v. 33, n. 1, p. 465-469, 2000.

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. The birds of South America. Volume I: The Oscine Passerines. **Oxford University Press**. v 1, p. 532, 1989.

RISING, J.; JARAMILLO, A.; COPETE, J. L.; MADGE, S.; RYAN, O. Family Emberizidae (Buntings and New World Sparrows). En J. Del Hoyo, A. Elliot y A. Christie (eds). Handbook of the Birds of the World (pp. 428-876). (Volume 16: Tanagers to New World Blackbirds). Barcelona: **Lynx Editions**. (2011). <https://doi.org/10.1525/auk.2013.130.3.555>

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, n. 11, p. 3494-3500, 1992.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999

(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003a.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4302-4307, 2003b.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 113-120, 2010.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, p. 667-1685, 2014.

SAKS, I.; KARU, U.; OTS, I.; HÔRAK, P. Do Standart Measures of Immunocompetence Reflect Parasite Resistance? The Case of Greenfinch Coccidiosis. **Functional Ecology**, v. 20, n. 1, p. 75-82, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: **FEPMVZ**, 2002.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203-208, 2006.

SCHNITZLER, B. E.; THEBO, P. L.; TOMLEY, F. M.; UGGLA, A.; SHIRLEY, M. W. PCR Identification of Chicken *Eimeria*: a Simplified Read-out, **Avian Pathology**, v. 28, n. 1, p. 89-93, 1999.

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 Parasitology**, v. 91, n. p. 635-647, 2005.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA, S. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 27-32, 2011.

SHIRLEY, M. W. Research on Avian Coccidia: Un Update. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 6, p. 479-499, 1992.

SICK, H. Ornitologia Brasileira, uma introdução. Edição revista e ampliada por J. F. Pacheco. **Editora Nova Fronteira**, Rio de Janeiro, 862 p, 1997.

SILVA, L. M. Espécies de coccídios em Thamnophilidae (Aves: Passeriformes) no Parque Nacional do Itatiaia, RJ: morfologia e taxonomia. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2016.

SILVEIRA, L. S.; MÉNDEZ, A. C. Caracterização das formas brasileiras do gênero *Sicalis* (Passeriformes, Emberizidae), **Atualidades Ornitológicas**, Ivaiporã, PR, n. 90, p. 6-8, 1999.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p. 262-266, 1955.

SORIANO-VARGAS, E.; MEDINA, J. P.; SALGADO-MIRANDA, C.; GARCIA-CONEJO, N.; GALINDO-SANCHEZ, K. P.; JANCZUR, M. K.; BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. *Eimeria pileata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-capped brush finch *Atlapetes pileatus* Wagler (Passeriformes: Emberizidae) in Mexico. **Systematic Parasitology**, v. 92, p. 261-265, 2015.

SORIANO-VARGAS, E.; SALGADO-MIRANDA, C.; ZEPEDA-VELÁZQUEZ, A. P.; MEDINA, J. P.; JANCZUR, M.K.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, M.; FLORES-VALLE, I. T.;

BERTO, B. P.; LOPES, C.W.G. *Eimeria atlapetesi* nom. nov., a replacement name for *Eimeria pileata* Soriano-Vargas et al., 2015 (Apicomplexa: Eimeriidae), preoccupied by *Eimeria pileata* Straneva and Kelley, 1979 (Apicomplexa: Eimeriidae), with observations on histopathology and phylogenetic analysis. **Zootaxa**, v. 4227, n. 1, p. 144-150, 2017.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n.4, p. 261-279, 2000.

STENSVOLD, C. R.; BESER, J.; AXEN, C.; LEBBAD, M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2311-2319, 2014.

STOTZ, D. F.; FITZPATRICK, J. W. PARKER III, T. A.; DEBRA. K. M. Neotropical birds: ecology and conservation. Chicago, USA: **University of Chicago Press**, 415p, 1996.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v.88, p. 388-394, 2002

SVOBODOVÁ, M.; CIBULKOVÁ, M. *Isospora* sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in Icterine Warbler (*Hippolais icterina*, Passeriformes: Sylviidae): the Possibility of Parents to Nestlings Transmission. **Acta Protozoologica**. v. 34, n.3, p. 233-235, 1995.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.

TULLY, T. N.; SHANE, S. M. Husbandry Practices as Related to Infections and Parasitic Diseases of Farmed Ratites. *Revue Scientifique et Technique-office International des Epizooties*, v. 15, n. 1, p. 73-89, 1996.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Hygiene**, v.10, p.269-383, 1929.

TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv für Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.

WENYON, C. M. Protozoology. A Manual for Medical Men, **Veterinarians and Zoologists**, New York: William, Wood and Company, v. 2, 1563p, 1926.

WIKEAVES. Canário-da-terra-verdadeiro – Canário-da-terra. <https://www.wikiaves.com.br/wiki/canario-da-terra>. Última modificação: 26/01/2022 às 14:58hr. 2021. Acesso em 27 de janeiro de 2022.

WILLIAMS, R. B. Anticoccidial Vaccines for Broilers Chickens: Pathways to Success. **Avian Pathology**, v. 31, p. 317-353, 2002.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

XIAO, L.; LIMOR, J.; LAL, A. A. Sequence Differences in the Diagnostic Target Region of the oocyst Wall Protein Gene of *Cryptosporidium* Parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2000a.

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5499-5502, 2000b.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. Springer: US, p. 108, 2006.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008.

ZAHEDI, A.; PAPARINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 88-109, 2016.

ZINKE, A.; SCHNEBEL, B.; DIERSCHKE, V.; RYLL, M. Prevalence and intensity of excretion of coccidial oocysts in migrating passerines on Helgoland. **Journal of Ornithology**, v. 145, p. 74-78, 2004.

ANEXO I

***Isospora bertoi* (Apicomplexa: Eimeriidae) de canário-da-terra, *Sicalis flaveola* (Passeriformes: Emberizidae) do Brasil**

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira¹; Samira Salim Mello Gallo¹; Taynara Kerolayne Santos Elizeu¹; Nicole Brand Ederli².

¹Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual de Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 28013-602, Brasil

²Instituto do Noroeste Fluminense de Educação Superior, Universidade Federal Fluminense. Avenida João Jasbick, Santo Antônio de Pádua, Rio de Janeiro, 28470-000, Brasil

Autor de correspondência: Samira Salim Mello Gallo, samiragallo@yahoo.com.br

RESUMO

Uma nova espécie de coccídio (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) obtida do tentilhão de açafão, *Sicalis flaveola*, é relatada no Brasil. Oocistos esporulados de *Isospora bertoi* n. sp. são esféricas a subesféricas; $23,61 \pm 1,20$ (21,14-26,54) x $22,04 \pm 1,24$ (19,41-24,56) μm ; índice de forma de $1,07 \pm 0,05$ (1,00-1,20) μm ; com parede lisa e bicamada, $\sim 1,12$ μm . Uma micrópila e um resíduo de oocisto estão ausentes, mas grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são elipsoidais alongados, $16,17 \pm 1,25$ (13,61-17,86) x $10,07 \pm 0,71$ (8,94-12,43) μm ; índice de forma de $1,61 \pm 0,12$ (1,33-1,90). O corpo da Stieda é em forma de botão; Corpo Substieda e para-Stieda ausente. O resíduo do esporocisto é compacto e composto por centenas de grânulos espalhados entre os esporozoítos. O esporozoíto é claviforme com corpo refrátil posterior alongado e núcleo.

Palavra-chave: *Isospora bertoi*; oocistos esporulados, tentilhão de açafão, coccídio

INTRODUÇÃO

O canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, é um pássaro pertencente à ordem Passeriforme e subordem Oscine, caracterizados por aves com dimensões diminutas e siringe mais complexa e desenvolvida, concedendo-lhes maior capacidade e habilidade canora (SILVEIRA e MÉNDEZ, 1999). Espécie principalmente granívora, inclui também em sua dieta, frutos e insetos que obtém no solo, estrato herbáceo, galhos e folhagens de até cinco metros de altura (ZOTTA, 1940; DE LA PEÑA; PENSIERO, 2003; DE LA PEÑA, 2011). Sua distribuição estende-se desde a América Central a América do Sul, com introdução no Havaí, Panamá, Porto Rico e Jamaica (RIDGELY e TUDOR 1989). Dentre as doenças que acometem pássaros, a coccidiose é considerada uma importante causa de enterite e morte das espécies (DE FREITAS et al., 2003) e segundo GALLO et al., (2014), diversas espécies de coccídeos ocorrem em uma mesma espécie de ave e a maioria dessas espécies não é patogênica, demonstrando a importância não apenas quantitativa, mas também qualitativa de seu diagnóstico (TEIXEIRA et al., 2014).

Até a presente data, duas espécies de *Isospora* foram descritas em *S. flaveola* de cativeiro no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil e foram identificadas como *Isospora cetasiensis* e *Isospora sicalisi* (COELHO et al., 2011). O presente estudo descreve uma nova espécie de *Isospora* encontrada em *S. flaveola* de vida livre com habitat na cidade de Eugenópolis no Estado de Minas Gerais, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais foram coletadas de 30 aves capturadas em rede de neblina ornitológicas modelo “mist net” no município de Eugenópolis no Estado de Minas Gerais, Brasil. Depois de capturadas, as aves foram alojadas por 24 horas em gaiolas com água e alimento *ad libitum*. As fezes presentes no fundo da gaiola foram acondicionadas em tubos de 15 mL, identificadas, colocadas em caixa isotérmicas com gelo e imediatamente transportadas ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As fezes foram filtradas em gaze dupla, misturadas com dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇), colocadas em placa de Petri e incubadas a 23-28°C até que 70% dos oocistos estivessem esporulados. Oocistos foram recuperados pelo método

de flutuação Sheather com solução de sacarose e examinados microscopicamente usando o método descrito por DUSZYNSKI e WILBER (1997). Observações morfológicas e mensurações, dadas em micrômetros, foram feitas usando microscópio óptico Eclipse i80 (Nikon, Japão). Fotomicrografias foram tiradas usando câmera digital Coolpix 5700 (Nikon, Japão) e os desenhos foram feitos por meio de sobreposição de imagens em diferentes focos com auxílio do software CorelDRAW versão 2020. Intervalos de tamanho foram fornecidos entre parênteses, seguidos pela média, desvio padrão e razão morfométrica (comprimento/largura).

RESULTADOS

Trinta Canários-da-terra de vida livre foram capturados e nas fezes de dois destes pássaros foram observados oocistos com características morfológicas diferentes de *I. sicalisi* e *I. cetasiensis*. Após o quarto dia, mais de 70% destes oocistos estavam com esporulação completa sob as condições usadas nesse estudo.

Isospora bertoi

Hospedeiro-tipo: *Sicalis flaveola* Linnaeus (Aves: Passeriformes: Emberizidae)

Material-tipo: Fotosintipos e desenhos lineares de oocistos esporulados estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrrj.br/labiococ/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Fotografias dos espécimes do hospedeiro tipo (simbiotipos) estão depositadas na mesma coleção. O número do repositório é P-126/2021.

Localidade-tipo: Eugenópolis (21°05'56" S e 42°11'13" O), Minas Gerais, Brasil.

Prevalência: 2/30 (6,7%)

Tempo de esporulação: 3 a 4 dias sob temperatura 23-28 °C.

Sítio de infecção: Desconhecido. Oocistos coletados de amostras fecais.

Etimologia: O nome específico é derivado do último nome do Professor Doutor Bruno Pereira Berto do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, concedido em sua homenagem por descrever as duas espécies de *Isospora* de *S. flaveola* e diversas outras espécies de coccídios em aves.

Descrição (Figuras 1 e 2)**Oocisto esporulado**

Oocistos subesféricos a elipsóides (n=32), $23,61 \pm 1,20$ (21,14-26,54) x $22,04 \pm 1,24$ (19,41-24,56); com índice morfométrico de $1,07 \pm 0,05$ (1,00-1,20). Parede dupla, $1,12 \pm 0,10$ (0,92-1,29) de espessura (n=18), superfície externa lisa representando 2/3 da espessura total; Micrópila e resíduo do oocisto ausentes; 1-2 grânulos polares de variados formatos e tamanho podendo ser bilobado (n=24), $2,96 \pm 0,59$ (1,90-4,06) x $2,23 \pm 0,63$ (1,12-3,64).

Esporocisto e esporozoítos

Esporocistos em formato de elipsoide alongado e afinando em ambas extremidades (n=37), $16,17 \pm 1,25$ (13,61-17,86) x $10,07 \pm 0,71$ (8,94-12,43) com índice morfométrico de $1,61 \pm 0,12$ (1,33-1,90); Corpo de Stieda presente em forma de botão, Corpo de Substieda e para-Stieda ausente. Resíduo do esporocisto compacto, composto de centenas de grânulos espalhados entre os esporozoítos. Esporozoíto claviforme com um corpo refrátil posterior alongado e um núcleo.



Figura 1. Fotomicrografias de *Isospora bertoi* n. sp. encontrado em canário da terra *Sicalis flaveola* de vida livre. Escalas: 10 μ m.

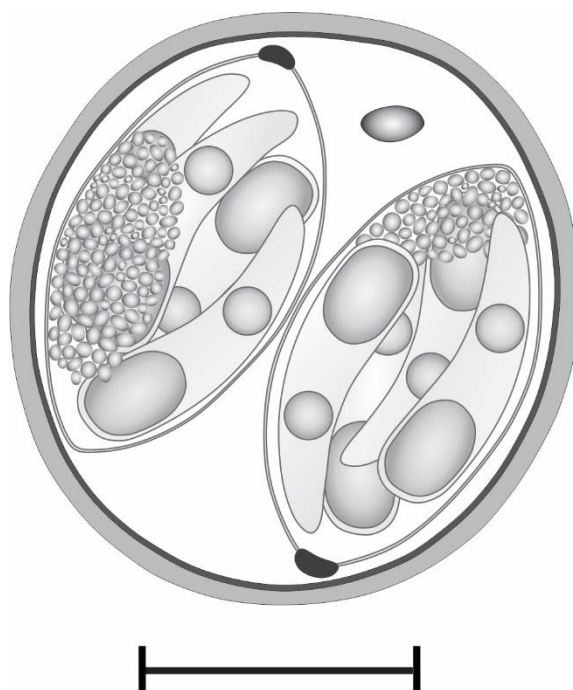


Figura 2. Desenho esquemático de *Isospora bertoi* n. sp. encontrado em canário da terra *Sicalis flaveola* de vida livre. Barra: 10 μ m.

DISCUSSÃO

O coccidio do presente estudo foi comparado em detalhes com espécies de coccidios já relatados em *Sicalis flaveola* como sugerido por Duszynski e Wilber (1997) para descrição de uma nova espécie. Além disso, foi comparado com coccidios parasitas de aves passeriformes do Novo Mundo também pertencentes à família Emberizidae, uma vez que é maior a probabilidade de transmissão de coccidios entre aves simpátricas (CARVALHO-FILHO et al., 2005; BERTO et al., 2009).

Duas espécies de *Isospora* foram descritas em *Sicalis flaveola* (Saffron finch) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (COELHO et al., 2011). *Isospora cetasiensis* difere de *I. bertoi* n. sp. por não possuir grânulo polar, seu esporocisto é ovóide com corpo de Substieda arredondado e corpo residual difuso (Tabela 1). O oocisto de *Isospora sicalisi* possui o maior tamanho (27,5 x 25,2 μ m) dentre as espécies descritas em *S. flaveola* e não possui grânulo polar (Tabela 1). Possui corpo de Substieda trapezoidal (Tabela 1) o que não foi observado na nova espécie descrita nesse trabalho e o resíduo do esporocisto é difuso, diferente do oocisto compacto de *I. bertoi* n. sp.

Em 1985, UPTON e colaboradores descreveram *Isospora paroariae* encontrada em *Paroaria coronata* (Red-crested cardinal) na Argentina. Essa espécie

além de possuir a parede do oocisto bem mais espessa do que a espécie descrita no presente estudo, não possui grânulo polar e seu esporocisto é ovóide com corpo de Substieda proeminente.

Nas ilhas de Galápagos em 1988, Mcquistion e Wilson descreveram quatro espécies de *Isospora* em *Camarhynchus parvulus* (Small tree finch) denominados *Isospora rotunda*, *Isospora fragmenta*, *Isospora exigua* e *Isospora temeraria*. Todas essas espécies descritas possuem parede simples e corpo de Substieda, o que as tornam diferentes de *I. bertoi* n. sp.. *Isospora exigua* não possui grânulo polar e seu tamanho médio (20,4 x 20,1 µm) é menor do que *I. bertoi* n. sp.. *Isospora fragmenta* e *I. temeraria* possuem grânulos polares de formato diferente e em maior quantidade quando comparada com a nova espécie de *Isospora* encontrada em *Sicalis flaveola* e descrita neste estudo.

No ano seguinte os mesmos autores descreveram *Isospora geospizae* em *Geospiza fuliginosa* (Small ground finch) e *Geospiza fortis* (Medium ground finch) também no arquipélago de Galápagos. O oocisto (15,5 x 14,5 µm) e esporocisto (10 x 7,5 µm) dessa espécie possuem um tamanho médio bem menor do que *I. bertoi* n. sp. além do oocisto possuir parede simples e o esporocisto corpo de Substieda.

Ainda no arquipélago de Galápagos, MCQUISTION em 1990 descreveu oocistos da espécie *Isospora daphnensis* em *G. fortis*. Esses oocistos além de possuírem medidas médias (27,3 x 23,6 µm) maiores que *I. bertoi* n. sp. também possuem a parede mais espessa (~1,5 µm). O esporocisto é ovóide com corpo de Stieda mamiliforme e corpo de Substieda pequeno.

Em 1997 na Venezuela, BALL e DASZAK descreveram oocistos de *Isospora tiaris* em *Tiaris fuliginosa* (Sooty grassquit) com medidas médias (27,1 x 23,8 µm) maiores que *I. bertoi* n. sp. Os esporocistos são ovoides com corpo de Substieda proeminente e resíduo difuso, características que destoam dos oocistos descritos no presente estudo.

Três novas espécies de *Isospora* foram descritas em *Sporophila caerulescens* (double-collared seedeater) por Carvalho-Filho em 2005 no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os oocistos dessas espécies nomeados como *Isospora sporophilae*, *Isospora flausinoi* e *Isospora teixeirafilhoi* são menores que os de *I. bertoi* n. sp.. Os esporocistos dessas espécies possuem formatos diferentes dos relatados na nova espécie de *Isospora* aqui descrita. Assim como os oocistos, os esporocistos também

possuem valores médios menores, com destaque para *I. teixeirafilhoi* que possuem esporocistos bem pequenos (11,7 x 8,1 µm).

No ano seguinte Silva e colaboradores descreveram três novas espécies de *Isospora* encontradas em *Oryzoborus angolensis* (Lesser seed-finch) no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. A parede do oocisto de *Isospora curio* é mais espessa quando comparada com *I. bertoi* n. sp. e não possuem grânulo polar. Os esporocistos são ovoides e possuem tamanhos médios bem menores (13,2 x 10,9 µm) que os descritos em *Sicalis flaveola* da presente pesquisa e o resíduo do esporocisto é difuso. Os oocistos de *Isospora braziliensis* são menores (17,8 x 16,9 µm) que os de *I. bertoi* n. sp., assim como os esporocistos (13,2 x 10,8 µm). A parede do oocisto é simples, grânulo polar ausente e resíduo do esporocisto difuso. Os oocistos de *Isospora paranaensis* também possuem parede simples e sua espessura média é de aproximadamente 1,5 µm. Os esporocistos são ovóides e possuem corpo de Substieda.

Em 2009, Berto e colaboradores descreveram três novas espécies de *Isospora* em *Sporophila frontalis* (Buffy-fronted seedeater) de Teresópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os oocistos (27,9 x 26,9 µm) e esporocistos (19,6 x 11,1 µm) de *Isospora frontalis* possuem tamanhos médios maiores que os encontrados em *I. bertoi* n. sp. A parede do oocisto difere de *I. bertoi* n. sp. por ser mais espessa (~1,4 µm) e os grânulos polares possuem formato de vírgula. Outras características como presença de corpo de Substieda e resíduo do esporocisto difuso diferenciam essas espécies. A espécie *Isospora teresopoliensis* difere de *I. bertoi* n. sp. pela falta de grânulo polar e pela presença de corpo de Substieda e resíduo do esporocisto difuso. Os oocistos de *Isospora chanchaoi* diferem morfologicamente da espécie descrita na presente pesquisa, com presença de corpo de Substieda, esporocisto de formato diferente e resíduo do esporocisto compacto, porém com grânulos de formato, tamanho e distribuição distintos.

No mesmo ano, Balthazar e colaboradores descreveram a espécie *Isospora ticoticoi* em *Zonotrichia capensis* (rufous-collared sparrow) também na cidade de Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. Ela possui corpo de Substieda compartimentalizado e resíduo do oocisto difuso, o que não foi observado em *I. bertoi* n. sp.

Oocistos de *Isospora bocamontensis* foram descritos em *Gubernatrix cristata* (Yellow cardinal) por PEREIRA et al., (2011) na cidade de Santa Maria, Estado do Rio

Grande do Sul, Brasil. Os oocistos dessa espécie são consideravelmente maiores (32,1 x 28,9 μm) que os descritos em *I. bertoi* n. sp. além de possuírem parede mais espessa (~1,5 μm). Os esporocistos possuem um formato distinto do observado em *I. bertoi* n. sp. e um corpo de Substieda proeminente o que não foi observado na espécie descrita neste estudo.

Em 2014, oocistos de *Isospora nigricollis* foram descritos em *Sporophila nigricollis* (Yellow-bellied Seedeater) na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil por Barreto (2014). Tanto os oocistos (18 x 17 μm) quanto os esporocistos (12 x 8 μm) possuem dimensões bem menores que as observadas em *I. bertoi* n. sp.. Além disso, o oocisto não possui grânulo polar e o esporocisto não é composto por resíduo.

Baseado nas características morfológicas e morfométricas, *Isospora bertoi* é considerada como nova espécie para ciência, representando a terceira espécie de *Isospora* descrita em *Sicalis flaveola*.

Tabela 1. Morfologia e morfometria de espécies do gênero *Isospora* encontradas em canários-da terra, *Sicalis flaveola*.

Espécies	<i>Isospora bertoi</i> n. sp.	<i>Isospora cetasiensis</i>	<i>Isospora sicalisi</i> *
Hospedeiro (Família)	<i>Sicalis flaveola</i> Linnaeus (Emberizidae)	<i>Sicalis flaveola</i> Linnaeus (Emberizidae)	<i>Sicalis flaveola</i> Linnaeus (Emberizidae)
Referências	Presente Pesquisa	Coelho et al. (2011)	Coelho et al. (2011)
Oocisto			
Formato	Subesférico a elipsoidal	Subesférico a elipsoidal	Subesférico a elipsoidal
Diâmetro maior	23,61 \pm 1,20 (21,14-26,54)	23,1 (19-27)	27,5 (25-29)
Diâmetro menor	22,04 \pm 1, 24 (19,41-24,56)	21,6 (19-26)	25,2 (22-28)
Índice morfométrico	1,07 \pm 0,05 (1,00-1,20)	1,1 (1,0-1,2)	1,1 (1,0-1,2)
Parede	Dupla	Dupla	Dupla
	1,12 \pm 0,10 (0,92-1,29)	1,0 (0,7-1,2)	1,1 (0,9-1,3)
Micrúpila	Ausente	Ausente	Ausente
Grânulo polar	1-2 (formatos variados)	Ausente	Ausente
Resíduo do oocisto	Ausente	Ausente	Ausente
Esporocisto			
Formato	Elipsóide alongado	Ovóide	Elipsóide
Diâmetro maior	16,17 \pm 1,25 (13,61-17,86)	15,1 (13-19)	17,2 (15-19)
Diâmetro menor	10,07 \pm 0,71 (8,94-12,43)	10,9 (10-13)	11,7 (11-12)
Índice morfométrico	1,61 \pm 0,12 (1,33-1,90)	1,4 (1,3-1,6)	1,5 (1,3-1,6)

Corpo de Stieda (LXA)	Botão	Botão (2,5x1,0)	Botão (2,0x1,5)
Corpo de Substieda (LXA)	Ausente	Arredondado (2,5x1,5)	Trapezoidal (6,0x2,5)
Resíduo do esporocisto	Granular Compacto	Granular Difuso	Granular Difuso
Esporozoíto			
Diâmetro maior	-	-	-
Diâmetro menor	-	-	-
Corpo refrátil	1	1	1
Núcleo	1	1	1

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa à T. K. S., Elizeu durante o desenvolvimento dessa pesquisa e também à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pela bolsa de Cientista do Nosso Estado (bolsa número 232568).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, S. J.; DASZAK, P. *Isospora tiaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sooty grassquit (*Tiaris fuliginosa*), a passeriform bird of South America. **American Society of Parasitologists**, v. 83, p. 465-466, 1997. DOI: 10.2307/3284411.

BALTHAZAR, L. M. C.; BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. *Isospora ticoticoi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis* in South America. **Acta Protozoologica**, v. 48, p. 345-349, 2009.

BARRETO, C. Ocorrência e identificação de coccídeos em amostras fecais de passeriformes silvestres (Aves: Passeriformes) no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA em Belo Horizonte. **Dissertação UFMG**, p. 57, 2014.

BERTO, B. P.; BALTHAZAR, L. M. C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buffy-fronted seedeater *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Passeriformes: Emberizidae) from

South America. **Systematic Parasitology**, v. 73, p. 65-69, 2009. DOI: 10.1007/s11230-009-9180-z.

CARVALHO-FILHO, P.; MEIRELES, G.; RIBEIRO, C.; LOPES C. W. G. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the double-collared seedeater, *Sporophila caerulescens* (Passeriformes: Emberizidae), from eastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 151-154, 2015 DOI: 10.1590/S0074-02762005000200007.

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.

DE FREITAS, M. F. L.; DE OLIVEIRA, J. B.; CAVALCANTI, M. D. B.; DE FREITAS, D. A. Occurrence of coccidiosis in canaries (*Serinus canarius*) being kept in private captivity in the state of Pernambuco, **Brazil Parasitol latinoamericano**. v. 58, n.1-2, p. 86-88, 2003.

DE LA PEÑA, M. R.; PENSIERO, J. F. Contribución de la flora en los hábitos alimentarios de las aves en un bos-que del centro de la provincia de Santa Fé, Argentina. **Ornitología Neotropical**, v. 14, p. 499-513, 2003.

DE LA PEÑA, M. R. Observaciones de campo en la alimentación de las aves. **Revista de Conservación Biológica**, v. 13, p. 1-88, 2011.

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

GALLO, S. S. M.; EDERLI, N. B.; BERTO, B. P.; OLIVEIRA, F. C. R. A new coccidian, *Isospora rheae* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae), from *Rhea americana* (Aves, Rheidae) from South America. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 236-238, 2014.

MCQUISTION, T. E.; WILSON, M. Four new species of *Isospora* from the small tree finch (*Camarhynchus parvulus*) from the Galapagos Island. **Journal of Parasitology**, v. 35, p. 98-99, 1988. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1988.tb04084.x.

MCQUISTION, T. E.; WILSON, M. *Isospora geospizae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the small ground finch (*Geospiza fuliginosa*) and the medium ground finch (*Geospiza fortis*) from the Galapagos Island. **Systematic Parasitology**, v. 14, p. 141-44, 1989. DOI: 10.1007/BF00016908.

MCQUISTION, T. E. *Isospora daphnensis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the medium ground finch (*Geospiza fortis*) from the Galapagos Island. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 30-32, 1990.

PEREIRA, L. Q.; BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; LOVATO, M.; LOPES, C. W. G. *Isospora bocamontensis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the yellow cardinal *Gubernatrix cristata* (Vieillot) (Passeriformes: Emberizidae) in South America. **Systematic Parasitology**, v. 78, p. 73-80, 2011. DOI: 10.1007/s11230-010-9278-3.

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. The birds of South America. **Oxford, University Press**, v. 1, p. 516, 1989.

SILVA, E. A. T.; LITERÁK, I.; KOUDELA, B. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the lesser seed-finch, *Oryzoborus angolensis* (Passeriformes: Emberizidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 573-576, 2006. DOI: 10.1590/S0074-02762006000500016.

SILVEIRA, L. S.; MÉNDEZ, A. C. Caracterização das formas brasileiras do gênero *Sicalis* (Passeriformes, Emberizidae), **Atualidades Ornitológicas**, Ivaiporã, PR, n. 90, p. 6-8, 1999.

TEIXEIRA, C. S.; GALLO, S. S. M.; EDERLI, N. B.; BERTO, B. P.; OLIVEIRA, F. C. R. *Isospora dromaii* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae) isolated from emus, *Dromaius novaehollandiae* (Casuariiformes, Casuariidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 3953-3955, 2014.

UPTON, S. J.; CURRENT, W. L.; CLUBB, S. L. Two new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from passeriform birds of South America. **Systematic Parasitology**, v. 7, p. 227-229, 1985. DOI:10.1007/BF00011453.

ZOTTA, A. Lista sobre el contenido estomacal de las aves argentinas. **Hornero**, v. 7 p. 402-411, 1940.

ANEXO II

Uma nova espécie de *Eimeria* Schneider, 1875 denominada *Eimeria flaveola* (Apicomplexa: Eimeriidae) de Canário-da-Terra, *Sicalis flaveola* (Passeriformes: Emberizidae) do Brasil

Samira Salim Mello Gallo¹; Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira¹; Taynara
Kerolayne Santos Elizeu¹; Nicole Brand Ederli².

¹Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual de Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 28013-602, Brasil

²Instituto do Noroeste Fluminense de Educação Superior, Universidade Federal Fluminense. Avenida João Jasbick, Santo Antônio de Pádua, Rio de Janeiro, 28470-000, Brasil

Autor de correspondência: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, foliveira@uenf.br

RESUMO

Eimeria flaveola do tentilhão de açafão, *Sicalis flaveola* (Passeriformes: Emberizidae) foi descrita no Brasil. Os oocistos esporulados são subesféricos; $22,67 \pm 1,57$ ($18,47-26,48$) x $21,19 \pm 1,42$ ($16,69-24,91$); índice de forma de $1,07 \pm 0,05$ ($1,00-1,25$) μm ; com parede lisa e bicamada, $\sim 1,09$ μm . Uma micrópila e um resíduo de oocisto estão ausentes, mas um grânulo polar está presente. Os esporocistos são ovóides, $14,24 \pm 1,71$ ($9,02-19,33$) x $9,98 \pm 1,02$ ($6,80-12,87$) μm ; índice de forma de $1,43 \pm 0,16$ ($0,74-2,11$). O corpo da Stieda é em forma de botão; Corpo Substieda e para-Stieda ausente. O resíduo do esporocisto é formado por uma massa compacta e arredondada de grânulos. O esporozoíto é claviforme, com 11.

Palavra-chave: *Eimeria flaveola*; oocistos esporulados, tentilhão de açafão, coccídio.

INTRODUÇÃO

O tentilhão açafirão (*Sicalis flaveola*) é um dos inúmeros exemplos de aves pertencentes à ordem Passeriforme e subordem Oscine, medindo entre 11 e 15 cm e apresentando acentuado dimorfismo sexual (RIDGELY e TUDOR, 1989). Em relação ao seu comportamento alimentar, as *S. flaveola* brasiliensis são aves do campo aberto e forrageiam próximo ao solo (SICK, 1997). São encontrados em toda a América do Sul em áreas abertas com árvores, incluindo pastagens, plantações e fazendas (GWYNNE et al., 2010).

São poucos os relatos de coccídeos do gênero *Eimeria* em passeriformes, no entanto, desde 1893 já havia descrição deste gênero parasitando esta ordem de pássaros no Velho Mundo (LABBÉ, 1893 a,b). Nas Américas, o relato de passeriformes infectados com coccídeos deste gênero é mais recente (BERTO et al., 2008; BERTO et al., 2009). Em canário-da-terra, *Sicalis flaveola*, ainda não foram relatadas, até a presente data, a presença de oocistos do gênero *Eimeria*, mas há relatos de pássaros da família Emberizidae infectados com *Eimeria atlapetesi* (SORIANO-VARGAS et al., 2017). O presente estudo descreve uma nova espécie de *Eimeria* encontrada em *S. flaveola* de vida livre com habitat na cidade de Eugenópolis no Estado de Minas Gerais, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais foram coletadas de 30 aves capturadas em rede de neblina ornitológicas modelo “mist net” no município de Eugenópolis no Estado de Minas Gerais, Brasil. Depois de capturadas, as aves foram alojadas por 24 horas em gaiolas com água e alimento *ad libitum*. As fezes presentes no fundo da gaiola foram acondicionadas em tubos de 15 mL, identificadas, colocadas em caixa isotérmicas com gelo e imediatamente transportadas ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As fezes foram filtradas em gaze dupla, misturadas com dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇), colocadas em placa de Petri e incubadas a 23-28°C até que 70% dos oocistos estivessem esporulados. Oocistos foram recuperados pelo método de flutuação Sheather com solução de sacarose e examinados microscopicamente usando o método descrito por Duszynski e Wilber (1997). Observações morfológicas

e mensurações, dadas em micrômetros, foram feitas usando microscópio óptico Eclipse i80 (Nikon, Japão). Fotomicrografias foram tiradas usando câmera digital Coolpix 5700 (Nikon, Japão) e os desenhos foram feitos por meio de sobreposição de imagens em diferentes focos com auxílio do software CorelDRAW versão 2020. Intervalos de tamanho foram fornecidos entre parênteses, seguidos pela média, desvio padrão e razão morfométrica (comprimento/largura).

RESULTADOS

Dois dos trinta canários da terra de vida livre examinados, eliminaram oocistos de *Eimeria* sp. nas fezes. Inicialmente, os oocistos não estavam esporulados, mas aproximadamente 70% dos oocistos esporularam no terceiro e foi verificado que no quarto dia mais de 80% destes já apresentavam esporulação completa sob as condições usadas nesse estudo.

Eimeria flaveola

Hospedeiro-tipo: *Sicalis flaveola* Linnaeus (Aves: Passeriformes: Emberizidae)

Material-tipo: Fotosintipos e desenhos lineares de oocistos esporulados estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de coccídeos, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Fotografias dos espécimes do hospedeiro tipo (simbiotipos) são depositadas na mesma coleção. O número do repositório é P-125/2021.

Localidade-tipo: Eugenópolis (21°05'56" S e 42°11'13" O), Minas Gerais, Brasil.

Prevalência: 2/30 (6,7%)

Tempo de esporulação: 3 a 4 dias sob temperatura de 23 à 28 °C.

Sítio de infecção: Desconhecido

Etimologia: O nome específico é derivado do nome da espécie do hospedeiro tipo.

Descrição (Figuras 1 e 2)

Oocisto esporulado

Oocistos subsféricos (n=150), $22,67 \pm 1,57$ (18,47-26,48) x $21,19 \pm 1,42$ (16,69-24,91); com índice morfométrico de $1,07 \pm 0,05$ (1,00-1,25). Parede dupla, $1,09 \pm 0,14$ (0,77-1,59) de espessura (n=90), superfície externa lisa representando 2/3 da espessura

total; Micrúpila e resíduo do oocisto ausente; 1 grânulo polar esférico a subesférico presente ($n=71$), $2,94\pm 0,44$ (1,83-3,96) x $2,13\pm 0,55$ (1,20-3,68).

Esporocisto e esporozoítos

Esporocistos ovóides ($n=104$) 4, $14,24\pm 1,71$ (9,02-19,33) x $9,98\pm 1,02$ (6,80-12,87); com índice morfométrico de $1,43\pm 0,16$ (0,74-2,11) com extremidade final arredondada; Corpo de Stieda ($n=3$) em forma de botão, $1,40\pm 0,26$ (1,19-1,77) de largura x $0,59\pm 0,12$ (0,5-0,76) de profundidade. Corpo de Substieda e para-Stieda ausente. Resíduo do esporocisto ($n=4$) presente formando uma massa compacta de grânulos, $5,98\pm 0,66$ (5,12-6,82) x $5,67\pm 0,47$ (5,15-6,20). Esporozoíto claviforme com 11,53 de comprimento e 2,84 de largura, com um corpo refrátil ($n=2$) de $3,66\pm 0,5$ (3,16-4,15) por $3,14\pm 0,72$ (2,42-3,85) e um núcleo arredondado medindo 2,04 por 1,91.

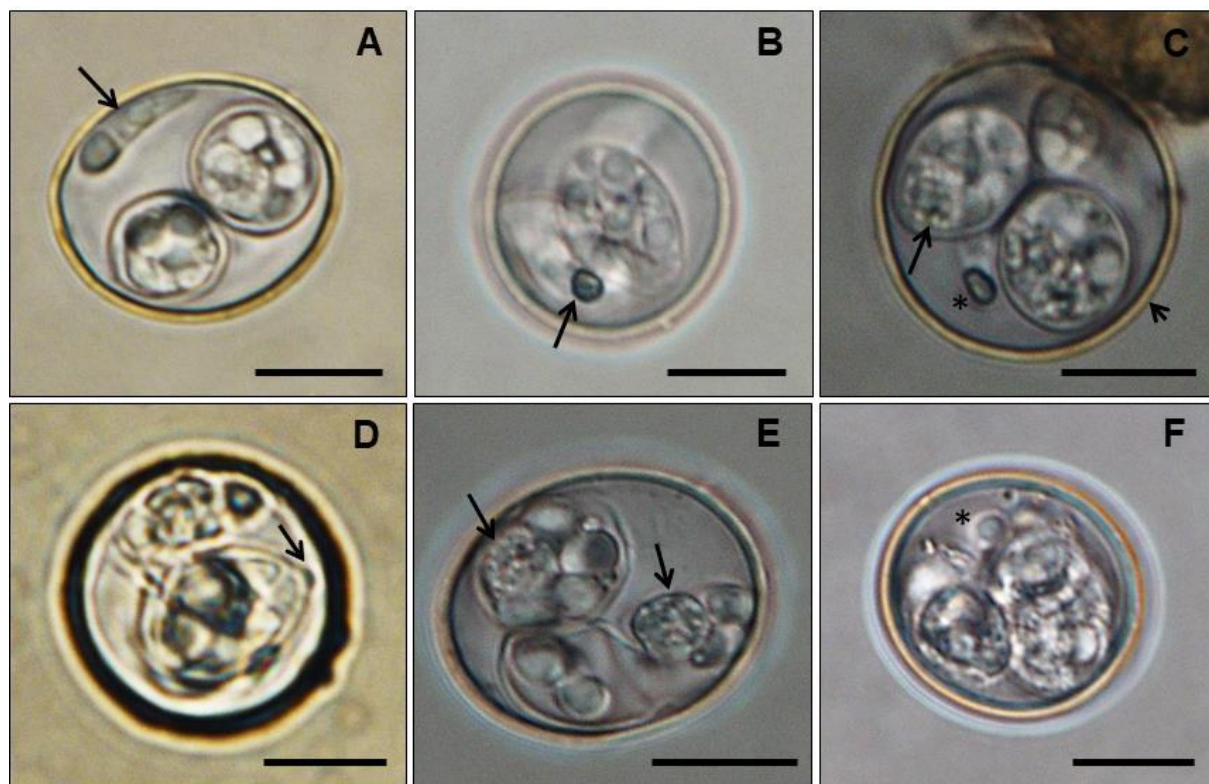


Figura 1. Fotomicrografias de *Eimeria flaveola* n. sp. encontrado no canário da terra *Sicalis flaveola*. Em **A**, esporozoíto (seta); em **B**, grânulo polar (seta); em **C**, resíduo do esporocisto (seta), grânulo polar (asterisco) e parede dupla do oocisto (cabeça de seta); em **D**, corpo de Stieda (seta); em **E**, resíduos dos esporocistos (setas) e em **F**, grânulo polar (asterisco). Escalas: 10 μ m.

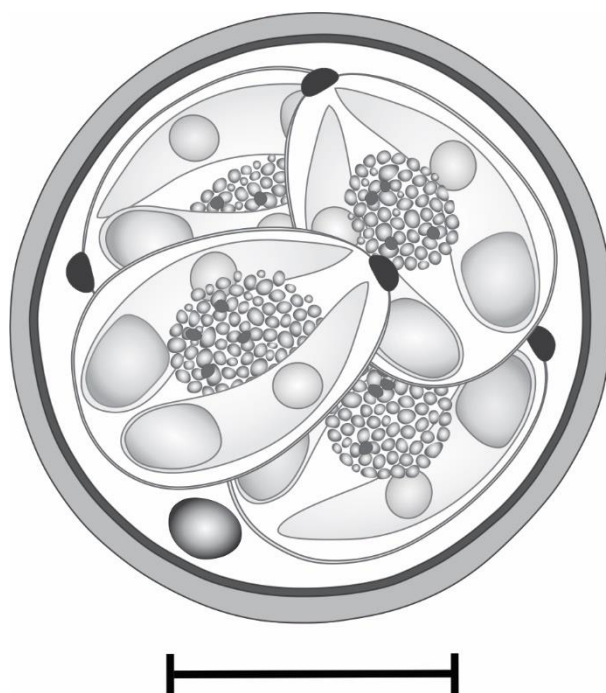


Figura 2. Desenho esquemático de *Eimeria flaveola* n. sp. encontrado no canário da terra *Sicalis flaveola*. Barra:10 μ m.

DISCUSSÃO

As descrições do gênero *Eimeria* na ordem Passeriformes são escassas. De acordo com (DUSZYNSKI e WILBER, 1997), uma nova espécie de coccidio precisa ser comparada em detalhes com espécies de coccidios que possuem características similares e pertençam a mesma família do hospedeiro. Existem na literatura 12 espécies de *Eimeria* spp. descritas na ordem Passeriformes com características morfológicas e morfométricas (LABBÉ, 1896; DUSZYNSKI et al., 1999; BERTO et al., 2008; BERTO et al., 2009; SORIANO-VARGAS et al., 2015, 2017; McALLISTER e HNIDA, 2019). Destas, oito foram encontradas em aves do Velho Mundo (DUSZYNSKI et al., 1999) e quatro relatadas em aves do Novo Mundo (BERTO et al., 2008; BERTO et al., 2009; SORIANO-VARGAS et al., 2015, 2017; McALLISTER e HNIDA, 2019). Além dessas, existe a *Eimeria grallinida* encontrada na ave *Grallina cyanoleuca* em Victoria na Austrália por (REECE, 1989) que relatou apenas estágios

de desenvolvimento hepático. Os oocistos esporulados tinham tamanho médio de 15x10 µm mas não foram fornecidos dados morfológicos.

Em 2019, Mcallister e Hnida, em OKLAHOMA, Estados Unidos, descreveram oocistos e esporocistos de *Eimeria hochatownensis* em *Hirundo rustica* da família Hirundinidae como elipsóides. A média do diâmetro menor (15,2 µm) dos oocistos é inferior ao relatado na presente pesquisa, o que justifica seu formato. Da mesma forma, a média do diâmetro menor do esporocisto (6,5 µm) é a metade da média do diâmetro maior (12,8 µm), o que caracteriza seu formato elipsóide diferente do relatado em *E. flaveola* n. sp.. Possui grânulos bilobados que variam de 1 a 3 diferenciando-se da presente espécie que possui um único grânulo polar simples. Outras características que distinguem essa espécie é o corpo de Stieda mamiliforme e esporozoíta sem núcleo.

Apenas uma espécie foi descrita na família Emberizidae, onde *S. flaveola* está inserido (SORIANO-VARGAS et al., 2015, 2017). *Eimeria atlapetesi* foi descrita em *Atlapetes pileatus* Wagler no México sendo os oocistos (16,5 x 14,1 µm) e esporocistos (9,0 x 5,4 µm) elipsoides e menores dos descritos em nossa pesquisa. Possui corpo de Stieda que varia de achatado a formato de meia-lua e possui corpo de Substieda, o que não foi descrito neste trabalho. Além disso, o esporozoíta não apresenta núcleo que está presente em *E. flaveola* n. sp..

As outras duas espécies de *Eimeria* descritas também em aves do Novo Mundo pertencem à família Tyrannidae. *Eimeria divinolimai* foi encontrada em *Casiornis rufus* (Vieillot) em Minas Gerais, Brasil (BERTO et al., 2008) e seu oocisto é diferente do descrito neste trabalho porque é menor (17,84 x 15,90 µm), sua parede dupla é mais grossa (2,13 µm), o corpo de Stieda é proeminente e o resíduo do esporocisto é granular, porém difuso. Além disso, o esporozoíta não apresenta núcleo. *Eimeria sicki* foi descrita em *Myiarchus ferox* (Gmelin) no Rio de Janeiro, Brasil (BERTO et al., 2009) e diferencia-se de *E. flaveola* n. sp. por serem oocistos bem maiores (30,3 x 28,5 µm) e não possuírem grânulo polar. Apesar do diâmetro menor do esporocisto possuir o mesmo tamanho médio (10 µm) dos encontrados na presente pesquisa, o diâmetro maior possui média superior (18,4 µm) o que caracteriza o formato elipsóide do esporocisto diferente de *E. flaveola* n. sp. que tem característica ovoide. *Eimeria sicki* também se diferencia de *E. flaveola* n. sp. por ter o corpo de Stieda achatado e mais largo (2,8 µm), possuir corpo de Substieda proeminente, o resíduo do esporocisto ser difuso e o esporozoíta não apresentar núcleo.

Devido a escassez de descrições de parasitos eimerianos da família Emberizidae e do Novo Mundo, *E. flaveola* n. sp. também foi comparada com *Eimeria balozeti*, *Eimeria anili*, *Eimeria malaccae*, *Eimeria depuytoraci*, *Eimeria paradisaeai*, *Eimeria saubenovae*, *Eimeria hochatownensis*, *Eimeria lucknowensis* e *Eimeria roscoviensis* de aves passeriformes pertencentes à diferentes famílias e encontradas no Velho Mundo.

Eimeria balozeti (YAKIMOFF e GOUSEFFE, 1938) foi encontrada na Rússia em *Sturnus vulgaris* Linnaeus da família Sturnidae e seu oocisto é oval e não apresenta grânulo polar. Além disso, o esporocisto não apresenta corpo de Stieda e resíduo, e o esporozoíta não possui núcleo.

Eimeria anili (HALDAR et al., 1982) foi descrita na Índia em *Sturnus contra* Linnaeus que pertence à mesma família de *S. vulgaris* Linnaeus. O oocisto é oval com tamanho médio do oocisto (15,7 x 12,8 µm) e esporocisto (8,2 x 5,2 µm) menor que os relatados em *E. flaveola* n. sp.. Possui micrúpila, mas não possui grânulo polar e o esporozoíta (7,0 x 1,7 µm) é menor quando comparado ao do presente estudo e não possui núcleo.

Ainda na Índia, (CHAKRAVART e KAR, 1944) descreveram *Eimeria malaccae* em *Lonchura malacca* (Linnaeus) da família Estrildidae como oval com presença de micrúpila e ausência de grânulo polar. O corpo de Stieda é pontiagudo e o corpo de Substieda possui formato de botão. O resíduo do esporocisto é difuso e o esporozoíta além de ser menor (8,3 x 2,1 µm), não possui corpo refrátil.

Eimeria depuytoraci (CERNÁ, 1976) foi encontrada na República Tcheca em *Sylvia curruca* (Linnaeus) pertencente à família Sylviidae. As dimensões dos oocistos (17-19 x 12-17µm) e esporocistos (8,0-9,0) são consideravelmente menores que os relatados em *E. flaveola* n. sp.. O corpo de Stieda do esporocisto é relatado pelo autor como indistinto não sendo possível sua visualização no desenho esquemático. Os esporozoítas não possuem núcleo e corpo refrátil.

No ano seguinte em Papua Nova Guiné, (VARGHESE, 1977) descreveu *Eimeria paradisaeai* em *Paradisae raggiana* Sclater da família Paradisaeidae como oocistos ovais com diâmetros, tanto de oocistos (30 x 26 µm) quanto de esporocistos (17 x 6 µm), superiores aos encontrados na presente pesquisa. O corpo de Stieda encontrado no esporocisto é relatado como distinto, porém, no desenho esquemático, se assemelha à forma achatada. Os esporozoítas não possuem núcleo.

Eimeria saubenovae da família Laniidae foi descrita em *Lanius collurio* Linnaeus no Cazaquistão por Dzerzhinskii e Kairullaev (1989). Os oocistos, esporocistos e esporozoítas dessa espécie possuem dimensões muito pequenas, além de possuírem parede simples. Não possuem corpo de Stieda e resíduo do esporocisto.

Outras duas espécies do gênero *Eimeria* foram descritas em *Motacilla alba* Linnaeus da família Motacillidae. *Eimeria lucknowensis* foi encontrada por MISRA (1946) na Índia como oocisto de formato oval sem grânulo polar. Os esporocistos são menores (8,5 x 6,0 μm) dos encontrados em *E. flaveola* n. sp. e não possuem corpo de Stieda. E o esporozoíta além de ser menor (7 μm) não possui corpo refrátil. *Eimeria roscoviensis* LABBÉ (1893a, b;1896) foi relatada na Rússia com oocistos e esporocistos de formato piriforme. Esses oocistos (16-18 x 14-16 μm) são bem menores dos encontrados na presente pesquisa além de possuírem uma pseudomicrópila e dois grânulos polares. Não foram fornecidos dados morfométricos de esporocistos e morfológicos de esporozoítas.

Baseado nas características morfológicas e morfométricas, consideramos *E. flaveola* uma nova espécie para ciência. Ela representa a quinta espécie descrita em aves passeriformes do Novo Mundo e também a segunda espécie descrita em ave da família Emberizidae.

Tabela 1. Morfologia e morfometria comparativa de *Eimeria* spp. relatadas de aves passeriformes do Novo Mundo.

Espécies	<i>Eimeria flaveola</i>	<i>Eimeria hochatownensis</i>	<i>Eimeria atlapetesi</i> *	<i>Eimeria divinolimai</i>	<i>Eimeria sicki</i>
Hospedeiro (Família)	<i>Sicalis flaveola</i> Linnaeus (Emberizidae)	<i>Hirundo rustica</i> Linnaeus (Hirundinidae)	<i>Atlapetes pileatus</i> Wagler (Emberizidae)	<i>Casiornis rufus</i> (Vieillot) (Tyrannidae)	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin) (Tyrannidae)
Referências	Presente Pesquisa	McAllister e Hnida (2019)	Soriano-Vargas et al. (2015, 2017)	Berto et al. (2008)	Berto et al. (2009)
Oocisto					
Formato	Subesferoidal	Elipsoidal	Elipsoidal	Subesferoidal	Esferoidal a subesferoidal
Diâmetro maior	22,67±1,57 (18,47-26,48)	25,5 (20-30)	16,5 (15-20)	17,84±1,52 (15,61-20,00)	30,3 (29-32)
Diâmetro menor	21,19±1,42 (16,69-24,91)	15,2 (12-17)	14,1 (13-15)	15,90±0,99 (14,15-17,80)	28,5 (26-30)
Índice morfométrico	1,07±0,05 (1,00-1,25)	1,7 (1,5-2,0)	1,17 (1,1-1,3)	1,12±0,05 (1,01-1,20)	1,1 (1,0-1,2)
Parede	Dupla 1,09±0,14 (0,77-1,59)	Dupla 1,0 (0,8-1,5)	Dupla 1,0 (0,9-1,1)	Dupla 2,13±0,16 (2,00-2,38)	Dupla 1,3 (1-2)
Micrúpila	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Grânulo polar	Presente (esférico a subesférico)	Bilobado (1 até 3)	Presente (1 ou 2)	Presente (subesférico)	Ausente
Resíduo do oocisto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Esporocisto					
Formato	Ovóide	Elipsóide	Elipsóide	Ovóide	Elipsóide
Diâmetro maior	14,24±1,71 (9,02-19,33)	12,8 (10,0-16,0)	9,0 (8-9)	14,98±0,85 (13,81-16,19)	18,4 (18-19)
Diâmetro menor	9,98±1,02 (6,80-12,87)	6,5 (5,0-8,0)	5,4 (5,0-6,0)	7,50±0,44 (6,76-8,09)	10 (9-11)
Índice morfométrico	1,43±0,16 (0,74-2,11)	2,0 (1,6-2,3)	1,67 (1,5-1,9)	-	1,8 (1,7-2)
Corpo de Stieda (LXA)	Botão (1,40x0,59)	Mamiliforme (1,1x2,2)	Achatado a formato meia-lua (0,5x1,5)	Proeminente	Achatado (0,5x2,8)
Corpo de Substieda (LXA)	Ausente	Ausente	Retangular a arredondado (1,0x2,0)	Ausente	Proeminente (2,4x3,0)
Resíduo do esporocisto	Granular Compacto	Granular Compacto ou irregular	Granular Compacto	Granular Difuso	Granular Difuso
Esporozoíto					
Diâmetro maior	11,53	-	-	-	-
Diâmetro menor	2,84	-	-	-	-
Corpo refrátil	1	1	1	1	1
Núcleo	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

*Originalmente descrita como *Eimeria pileata* (ver Soriano-Vargas et al., 2015); nome de substituição acima (ver Soriano-Vargas et al., 2017).

Tabela 2. Morfologia e morfometria comparativa de *Eimeria* spp. relatadas de aves passeriformes do Velho Mundo.

Espécies	<i>Eimeria flaveola</i>	<i>Eimeria balozeti</i>	<i>Eimeria anili</i>	<i>Eimeria malaccae</i>	<i>Eimeria depuytoraci</i>	<i>Eimeria paradisaeai</i>	<i>Eimeria saubenovae</i>	<i>Eimeria lucknowensis</i>	<i>Eimeria roscoviensis</i>
Hospedeiro (Família)	<i>Sicalis flaveola</i> Linnaeus (Emberizidae)	<i>Sturnus vulgaris</i> Linnaeus (Sturnidae)	<i>Sturnus contra</i> Linnaeus (Sturnidae)	<i>Lonchura malacca</i> (Linnaeus) (Estrilidae)	<i>Sylvia curruca</i> (Linnaeus) (Sylviidae)	<i>Paradisae raggiana</i> Sclater (Paradisaeidae)	<i>Lanius collurio</i> Linnaeus (Laniidae)	<i>Motacilla alba</i> Linnaeus (Motacillidae)	<i>Motacilla alba</i> Linnaeus (Motacillidae)
Referências	Presente Pesquisa	Yakimoff e Gouseffe (1938)	Haldar et al. (1982)	Chakravarty e Kar (1944)	Cerná (1976)	Varghese (1977)	Dzerzhinskii e Kairullaev (1989)	Misra (1946)	Labbé (1893a,b; 1896)
Oocisto									
Formato	Subesferoidal	Oval	Oval	Oval	Esferoidal ou oval	Oval	Esferoidal	Oval	Piriforme
Diâmetro maior	22,67±1,57 (18,47-26,48)	19,52-30,60	15,7 (14,1-17,4)	26,8-30,9	Esferoidal: 13-14 Oval: 17-19	30,0 (28,0-31,0)	10,1	21,4-24,5	16,0-18,0
Diâmetro menor	21,19±1,42 (16,69-24,91)	17,08-26,60	12,8 (12,3-13,3)	16,4- 18,5	Oval: 12-17	26 (24 a 28)	10,1	17,4-18,8	14,0-16,0
Índice morfométrico	1,07±0,05 (1,00-1,25)	1 (0,70-0,87)	-	-	-	1-1,1	-	-	-
Parede	Dupla 1,09±0,14 (0,77-1,59)	Dupla	Dupla	Dupla	Dupla	Dupla	Simples 0,5	Dupla	Dupla
Micrópila	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Pseudomicrópila
Grânulo polar	Presente (esférico a subsférico)	Ausente	Ausente	Ausente	Presente (1 ou 2)	Presente	Presente	Ausente	Presente 2
Resíduo do oocisto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Esporocisto									
Formato	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Ovóide	Piriforme
Diâmetro maior	14,24±1,71 (9,02-19,33)	12,20-14,40	8,2 (7,3-9,1)	12,4	8,0-9,0	17,0 (14,0-18,0)	5,8	8,5	-
Diâmetro menor	9,98±1,02 (6,80-12,87)	7,20-8,54	5,2 (5,0-5,5)	10,3	-	6,0	2,9	6,0	-
Índice morfométrico	1,43±0,16 (0,74-2,11)	-	1,2	-	-	-	-	-	-
Corpo de Stieda (LXA)	Botão (1,40x0,59)	Ausente	Presente	Pontiagudo	Indistinto	Distinto	Ausente	Ausente	Botão
Corpo de Substieda (LXA)	Ausente	Ausente	Ausente	Botão	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Resíduo do esporocisto	Granular Compacto	Ausente	Granular Compacto	Granular Difuso	Granular Compacto	Granular Compacto	Ausente	Granular Compacto	Granular Compacto
Esporozoítio									
Diâmetro maior	11,53	-	7,0 (6,7-7,3)	8,3	-	-	2,9	7,0	-
Diâmetro menor	2,84	-	1,7 (1,7-1,7)	2,1	-	-	1,45	-	-
Corpo refrátil	1	1	1	Ausente	Ausente	1	-	Ausente	-
Núcleo	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	-	Presente	-

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa à T. K. S., Elizeu durante o desenvolvimento dessa pesquisa e também à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pela bolsa de Cientista do Nosso Estado (bolsa número 232568).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Eimeria divinolimai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the rufous casinornis *Casinornis rufus* Vieillot, 1816 (Passeriformes: Tyrannidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 33-35, 2008.

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.

CERNA', Z. Two new coccidians from passeriform birds. **Folia Parasitologica**, v. 23, p. 277-279, 1976.

CHAKRAVARTY, M.; KAR, A. B. Studies on the coccidia of Indian birds II. Observations on several species of coccidia of the subfamilies Cyclosporinae and Eimeriinae. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v. 20, p. 102-114, 1944.

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

DUSZYNSKI, D. W.; UPTON, S. J.; COUCH, L. The coccidia of Passeriformes (*Eimeria*), 1999. Disponível em: <http://eimeria.unl.edu/passers.html>. Último acesso: 15 de setembro de 2021.

DZERZHINSKII, V. A.; KAIRULLAEV, K. K. Coccidia from wild animals in lower region of the river Turgai. *Izvestiya Akademia Nauk Kazachskoi SSR, Seriya Biologicheskikh Nauk*, v. 2, p. 30-34, 1989.

GWYNNE, J. A.; RIDGELY, R. S.; TUDOR, G.; ARGEL, M. Aves do Brasil: Pantanal e Cerrado. São Paulo: **Editora Horizonte**. p. 322, 2010.

HALDAR, D. P.; RAY, S. K.; MANDAL, R. K. A new coccidium, *Eimeria anili* n. sp. from an Indian passerine bird. *Archiv fu'r Protistenkunde*, v. 126, p. 217-219, 1982.

LABBÉ, A. Sur les coccidies des oiseaux. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, Series, v. 3, n. 116, p. 1300-303, 1893.

LABBÉ, A. Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur less coccidies. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, v. 24, p. 517-654, 1896.

MCALLISTER, C. T.; HNIDA, J. A. A New *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Barn Swallow, *Hirundo rustica* (Aves: Passeriformes: Hirundinidae), in Southeastern Oklahoma: The Fourth *Eimeria* Species from New World Passeriformes. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 693-696, 2019.

MISRA, P. L. On three coccidian parasites, *Wenyonella mackinnoni* n. sp., *Eimeria lucknovensis* n. sp., and *Isoispora* sp., from the intestine of the wagtail, *Monacilla alba* Linn. (Passeriformes: Motacillidae). *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, v. 25, p. 75-85, 1947.

REECE, R. L. Hepatic coccidiosis (*Eimeria* sp) in a wild magpie-lark (*Grallina cyanoleuca*), *Avian Pathology*, v. 18, n. 2, p. 357-362, 1989. DOI: 10.1080/03079458908418609.

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. The birds of South America. Oxford, **University Press**, v. 1, p. 516, 1989.

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

SORIANO-VARGAS, E.; MEDINA, J. P.; SALGADO-MIRANDA, C.; GARCIA-CONEJO, N.; GALINDO-SANCHEZ, K. P.; JANCZUR, M. K.; BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. *Eimeria pileata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-capped brush finch *Atlapetes pileatus* Wagler (Passeriformes: Emberizidae) in Mexico. **Systematic Parasitology**, v. 92, p. 261-265, 2015.

SORIANO-VARGAS, E.; SALGADO-MIRANDA, C.; ZEPEDA-VELÁZQUEZ, A. P.; MEDINA, J. P.; JANCZUR, M.K.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, M.; FLORES-VALLE, I. T.; BERTO, B. P.; LOPES, C.W.G. *Eimeria atlapetesi* nom. nov., a replacement name for *Eimeria pileata* Soriano-Vargas et al., 2015 (Apicomplexa: Eimeriidae), preoccupied by *Eimeria pileata* Straneva and Kelley, 1979 (Apicomplexa: Eimeriidae), with observations on histopathology and phylogenetic analysis. **Zootaxa**, v. 4227, n. 1, p. 144-150, 2017.

VARGHESE, T. *Eimeria paradisaei* sp.n. and *Isospora raggianai* sp.n. from the Raggiana bird of paradise (*Paradisaea raggiana* Sclater) from Papua New Guinea. **Journal Parasitology**, v. 63, p. 887-889, 1977.

YAKIMOFF, W. L.; GOUSSEFF, W.F. *Eimeria balozeti* n. sp., coccidie nouvelle de *Sturnus vulgaris*. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v. 27, p. 282-283, 1938.

ANEXO III

Caracterização molecular e filogenética de espécies de *Cryptosporidium* em canário-da-terra, *Sicalis flaveola*

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira¹, Samira Salim Mello Gallo¹, Taynara Kerolayne Santos Elizeu¹, Nicole Brand Ederli².

¹Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual de Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 28013-602, Brasil

²Instituto do Noroeste Fluminense de Educação Superior, Universidade Federal Fluminense. Avenida João Jasbick, Santo Antônio de Pádua, Rio de Janeiro, 28470-000, Brasil

Autor de correspondência: Samira Salim Mello Gallo, samiragalho@yahoo.com.br

RESUMO

Cryptosporidium é o protozoário mais comum que pode infectar uma ampla variedade de animais, incluindo mamíferos e aves. Amostras fecais de canários-da-terra *Sicalis flaveola* provenientes de um estabelecimento comercial foram rastreadas para presença de *Cryptosporidium* pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e nested PCR do gene 18S rRNA seguido de sequenciamento do fragmento amplificado. Foi identificado a espécie *C. galli* nos seis canários-da-terra além de *C. andersoni* em uma das aves caracterizando uma infecção mista. Apenas duas aves apresentaram penas eriçadas e sujas de fezes. Infecção concomitante com *Isospora* spp. foi observada em todas as aves. Conclui-se que este é o terceiro relato de parasitismo por *C. galli* em *S. flaveola* e que esta ave é uma possível hospedeira de *C. andersoni*.

Palavra-chave: *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium andersoni*, tentilhão de açafão, coccídio.

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa, classe Coccidea, ordem Eucoccidiorida e família Cryptosporidiidae (FAYER, 2007). *Cryptosporidium* é um dos mais importantes protozoários parasitas que podem ser transmitidos através da contaminação de alimentos e água e é reconhecido como um dos principais contribuintes para a morbidade e estima-se que cause uma perda global anual de 13 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (KHALIL et al., 2018).

Cryptosporidium é caracterizado por extensa variação genética e patogenicidade. Até o momento, existem 44 espécies válidas e cerca de 60 genótipos relatados em todo o mundo (ČONDLOVÁ et al., 2018; HOLUBOVÁ et al., 2020; WANG et al., 2017; XIAO et al., 2004). Existem 8 espécies de *Cryptosporidium* que infectam aves: *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium ornithophilus*, *Cryptosporidium proventriculi*, *Cryptosporidium avium*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium andersoni* (RYAN et al., 2021, WANG et al., 2021).

Cryptosporidium baileyi infecta o epitélio de uma grande variedade de órgãos, como a traqueia e a bolsa de Fabricius, enquanto *C. meleagridis* está localizada no intestino delgado e ceco (ZHA E JIANG, 1994; BERMUDEZ et al., 1987). *Cryptosporidium galli* causa alterações no proventrículo à medida que o parasita se desenvolve nas células epiteliais deste órgão e não afeta nem os intestinos nem o trato respiratório (PAVLÁSEK, 1999).

O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar molecularmente espécies de *Cryptosporidium* em amostras fecais de tentilhões de açafão, *Sicalis flaveola*, de uma fazenda comercial na cidade de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais e método de Ziehl-Neelsen

Foram coletadas amostras fecais de seis canários-da-terra, *Sicalis flaveola*, adultos de um estabelecimento comercial na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio

de Janeiro, Brasil. As seis aves estavam em gaiolas separadas e todo conteúdo fecal depositado no fundo da gaiola durante o período de 24 horas foi coletado e acondicionado em tudo coletor estéril. Os tubos foram identificados e transportados em caixas isotérmicas com gelo ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Uma parte do conteúdo fecal foi examinada quanto à presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por microscopia de esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada de acordo com Angus (1987).

Extração de DNA e nested PCR

Da outra parte do conteúdo fecal foi extraído o DNA genômico usando o kit DNA and Tissue (QIAGEN) com algumas modificações do protocolo do fabricante (SANTÍN et al., 2004). As amostras de DNA foram estocadas a -20°C e todas as amostras foram submetidas à triagem de *Cryptosporidium* por meio da nested PCR (n-PCR) para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene rRNA (XIAO et al., 1999, 2000), com sequenciamento subsequente de fragmentos amplificados. Os iniciadores P1: 5-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3, P2: 5-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3 e P3: 5-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3, P4: 5-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3 foram usados para as reações primárias (~1325 bp) e secundárias (~830 bp), respectivamente. Além disso foram utilizados como controles positivos o DNA de *Cryptosporidium parvum* e negativa água ultrapura.

Sequenciamento e análise filogenética

O fragmento amplificado (~830 pb) resultante da reação secundária da n-PCR foi purificado, utilizando o kit “GFX PCR DNA band purification®” (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA), e sequenciado com o auxílio do kit DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing® (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA) no sequenciador MegaBACE® (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA). Reações de sequenciamento foram realizadas no mínimo três vezes em ambas direções com os primers da reação secundária da n-PCR. A sequência consensus foi analisada usando o software CodonCode Aligner v.2.0.4 (CodonCode Corp., Dedham, MA) e alinhadas

com sequencias de referência de *Cryptosporidium* publicadas no GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando o software MEGA X (Kumar et al., 2018), pelo método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), após estimativa da distância utilizando o modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980). Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas do conjunto de dados (opção de exclusão completa). Na construção da árvore filogenética, *Eimeria tenella* (KT184354) foi utilizada como grupo externo. A confiança dos grupos foi avaliada por valores de bootstrap usando 1000 réplicas.

As seguintes sequências foram usadas para construir a árvore filogenética: MK311144 (*C. baileyi*) de *Erythrura gouldiae*, GQ227475 (*C. baileyi*) de *Sicalis flaveola*, MK311145 (*C. baileyi*) de *Carduelis psaltria*, MK311141 (Aviária genótipo I) de *Serinus canaria*, GQ227479 (genótipo aviário I) de *Serinus canaria*, HM116381 (genótipo aviário V) de *Nymphicus hollandicus*, DQ650341 (genótipo aviário II) de *Eolophus roseicapilla*, DQ002931 (genótipo aviário II) de *Struthio camelus*, HM116382 (*C. meleagridis*) de *Columba liviagris*, HM116383 (*C. meleagridis*) de *Bombycilla garrulus*, HM116384 (*C. meleagridis*) de *Streptopelia orientalis*, DQ650344 (genótipo aviário IV) de *Zosterops japonica*, MK311135 (*C. proventriculi*) de *Poicephalus gularis*, MK311136 (*C. proventriculi*) de *Agapornis rosellii*, GU816048 (*C. galli*) de *Sicalis flaveola*, GU816049 (*C. galli*) de *Saltator similis*, GU816054 (*C. galli*) de *Sporophila angolensis*, KT175411 (*C. andersoni*) de águas residuais de matadouro, MT648437 (*C. andersoni*) from *Cygnus sp.*, KJ939306 (*C. parvum*) de *Accipiter nisus*, MH636820 (*C. parvum*) de uma ave não especificada, KU058877 (*C. avium*) de *Melopsittacus undulatus*, KU058878 (*C. avium*) de *Cyanoramphus novaezelandiae*, MN969963 (*C. ornithophilus*) de *Nymphicus hollandicus* e MN969962 (*C. ornithophilus*) isolado de *Anser anser*.

Número de acesso as sequencias de nucleotídeos

As sequencias de nucleotídeos do gene 18S rRNA foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso OM436006-OM436011 (*C. galli*) e OM491513 (*C. andersoni*).

RESULTADOS

Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em todas as amostras fecais através da análise microscópica dos esfregaços corados pela técnica de Ziehl Neelsen (Figura 1).

A análise molecular revelou amplificação do DNA de *Cryptosporidium* em todas as amostras analisadas. Ao sequenciar o fragmento amplificado por n-PCR, a espécie *C. galli* foi identificada em todas as amostras, mas em uma das aves foi detectada uma infecção mista, pois em uma das corridas de sequenciamento foi identificada a espécie *C. andersoni*. Os isolados de *C. galli* do presente estudo compartilharam 99,71-100% de similaridade com outros isolados de *C. galli* de acordo com a análise nBlast, e o isolado de *C. andersoni* de uma das aves compartilhou 100% de identidade com *C. andersoni* isolado de mamíferos e aves . A caracterização molecular das sete amostras de *Cryptosporidium* foi realizada com reconstruções filogenéticas do gene 18S rRNA usando um total de 343 posições no conjunto de dados final. A reconstrução filogenética de isolados de *Cryptosporidium* de *S. flaveola* pode ser vista na Figura 2.

Os oocistos esporulados de *C. galli* (n=117) mediram em média $5,81 \pm 0,78$ (3,97-8,09) por $4,86 \pm 0,66$ (3,3-7,23) μm com relação comprimento/largura de $1,20 \pm 0,12$ (0,95-1,50). Não foram mensurados oocistos de *C. andersoni*. Na análise microscópica também foi detectado oocistos de *Isospora* spp.. Duas aves apresentaram penas eriçadas e sujas de fezes.

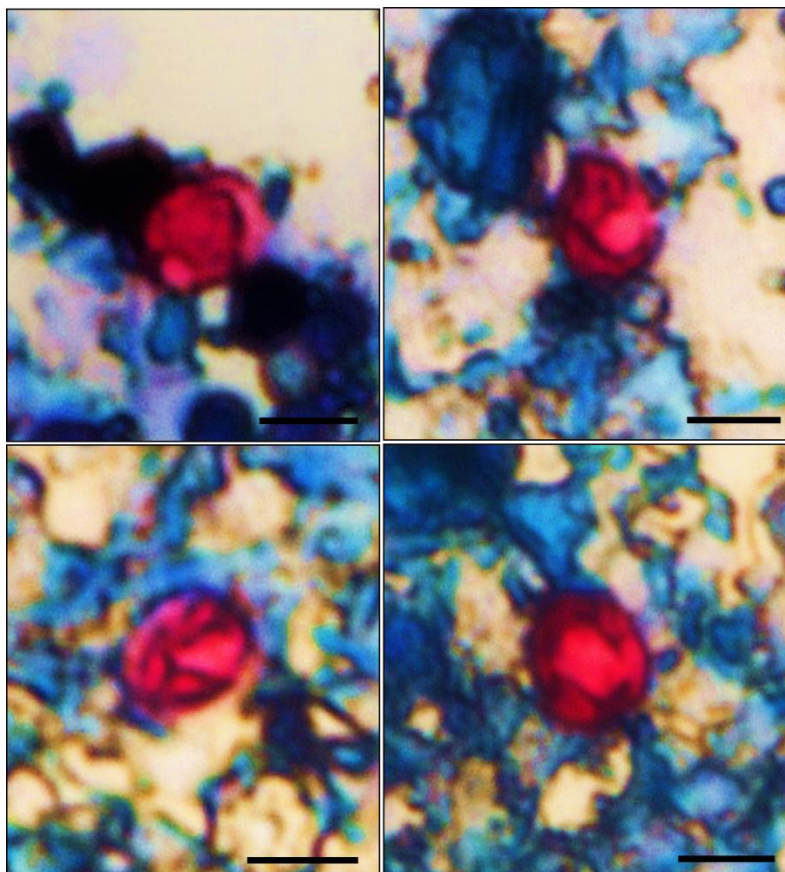


Figura 1. Oocistos esporulados de *Cryptosporidium galli* corados pela técnica de Ziehl Neelsen modificada. Barras: 5 μ m.

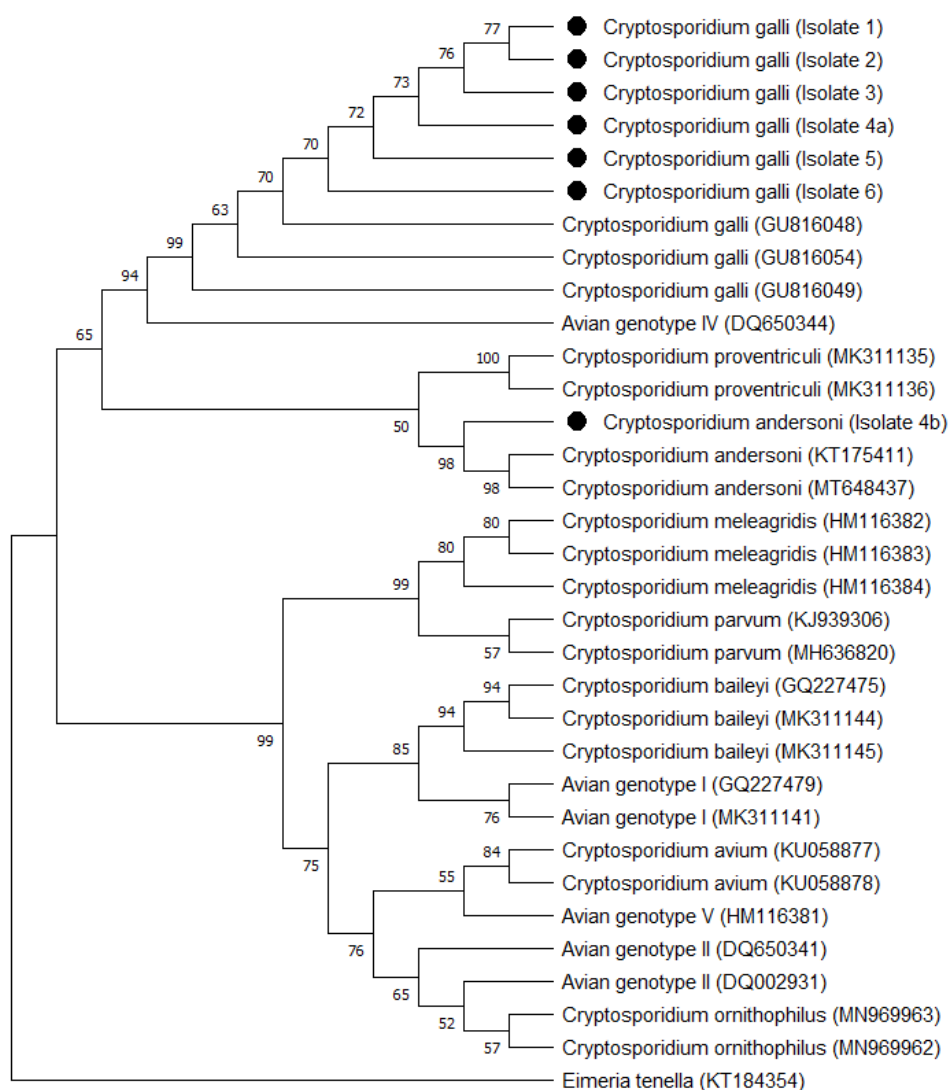


Figura 2. Análise filogenética de *Cryptosporidium* spp. usando método estatístico Neighbor-Joining modelo Kimura-2 parâmetros baseado nas sequencias isoladas do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* desse experimento e outras espécies de *Cryptosporidium*.

DISCUSSÃO

As técnicas comuns usadas para diagnosticar infecção de *Cryptosporidium* são análise microscópica e n-PCR (JEX et al., 2008). Apesar da microscopia ser um trabalho intensivo que demanda tempo e experiência, a extração de DNA das amostras fecais de *S. flaveola* só foi realizada mediante microscopia prévia. Conforme discutido por Nakamura et al. (2009), fazer a PCR em amostras previamente positivas pela microscopia implica em menor custo, pois são reagentes caros. A microscopia é

uma técnica barata e rápida; porém, não identifica espécies de *Cryptosporidium* e é menos sensível e específica. Diante disso, foi realizada a n-PCR por possibilitar a identificação da espécie após o sequenciamento do amplicon.

No presente estudo, identificamos apenas 2 das 8 espécies de *Cryptosporidium* já encontradas em aves. A positividade de 100% dos canários-da-terra, família Emberizidae, foi alta, mas o número de amostras coletadas e analisadas foi baixo dificultando a comparação da prevalência com a maioria dos estudos de *Cryptosporidium* em aves de cativeiro e silvestres. Um fator que pode interferir na taxa de infecção por *Cryptosporidium* é a diferença na idade dos animais (GRAAF et al., 1999; NICHOLS, 2008), embora quase todos os relatos de infecções por *Cryptosporidium* em aves de cativeiro ou selvagens não especifiquem a faixa etária dos animais examinados.

Silva et al. (2010) realizou um estudo onde foram coletadas 480 amostras de fezes de passeriformes de Araçatuba, São Paulo. Dessas amostras, 105 estavam positivas para *Cryptosporidium* sendo identificado por n-PCR e sequenciamento apenas a espécie *C. galli*. Similarmente, Antunes et al. (2008), detectou a espécie *C. galli* em todas as amostras estudadas através de análise molecular, sendo quatro canários (*Serinus canaria*) e oito calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) de cativeiro. Estes trabalhos corroboram com o presente estudo que detectou a espécie *C. galli* em todas as amostras positivas por PCR.

O tamanho médio dos oocistos de *C. galli* obtidos no presente estudo foi menor do que o tamanho médio de *C. galli* relatado por Ryan et al. (2003) e por Qi et al. (2011). A coloração ácido-resistente causa encolhimento e deformação dos oocistos e isso poderia explicar o menor tamanho dos oocistos neste estudo em comparação com outros estudos. Como os tamanhos dos oocistos de diferentes espécies de *Cryptosporidium* são muito semelhantes, a morfometria dos oocistos por si só não é suficiente para distinguir as espécies, tornando necessários estudos moleculares para uma identificação precisa.

Dentre as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* em aves, apenas duas espécies, nomeadas, *C. baileyi* e *C. galli*, foram identificadas em canários-da-terra *S. flaveola* em estudos anteriores (NAKAMURA et al., 2009; SEVÁ et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014). Nakamura et al. (2009) realizou um estudo com 966 amostras de fezes de aves pertencentes a 18 famílias. Essas aves de cativeiro ou selvagens eram provenientes de três estados brasileiros: Goiás, Paraná e São Paulo.

Em um exemplar de *S. flaveola* foi diagnosticado através de PCR e sequenciamento do gene 18S rRNA, a espécie *C. baileyi* (GQ227475). Em 2012, Sevá e colaboradores analisaram 242 amostras fecais de aves selvagens apreendidas pela agência de controle ambiental do Estado de São Paulo. Quatro *S. flaveola* estavam positivos para *Cryptosporidium* sendo que três aves albergavam a espécie *C. galli* (GU816048, GU816069, HM126668) e uma a espécie *C. baileyi* (GU816042). Nakamura et al. (2014) coletou um total de 1027 amostras fecais de aves das ordens Psittaciformes e Passeriformes. Essas aves eram de cativeiro ou selvagens e provenientes da Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre – DEPAVE-3 de São Paulo. Das 108 amostras positivas, 40 foram sequenciadas e uma delas era de *S. flaveola* e estava positiva para *C. galli* através do sequenciamento da n-PCR (número de acesso não disponibilizado no GenBank). Mesmo a nossa pesquisa ser o terceiro relato de diagnóstico de *C. galli* em *S. flaveola* ainda se faz necessário mais estudo sobre espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* que podem infectar essa espécie de passeriformes.

Uma co-infeccao de *C. galli* e *C. andersoni* ocorreu em uma das aves do presente estudo, embora apenas mono infecções foram previamente encontradas em *S. flaveola* em estudos anteriores (NAKAMURA et al., 2009; SEVÁ et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014).

De acordo com Maca e Pavlásek (2016), a criacao intensiva de aves em criadouros pode ser problemática, pois está associada a um grande número de aves em uma área relativamente pequena, aumentando assim a possibilidade de doenças bacterianas, virais e parasitárias e sua rápida disseminacao em comparaçao com aves selvagens. As aves do presente estudo viviam em gaiolas separadas, porém dispostas no mesmo ambiente e próximas umas das outras. Assim como exposto por Nakamura et al. (2014), isso pode resultar na disseminacao da infeccao por meio do contato direto com fezes ou no transporte humano de oocistos durante o manejo rotineiro relacionado à limpeza. Além disso, as gaiolas dos canários-da-terra ficavam próximas de gaiolas de aves de outras espécies o que pode contribuir para disseminacao interespecífica de infecções por *Cryptosporidium*.

As infecções por *C. galli*, especificamente, estão associadas a outros patogenos (LINDSAY et al., 1991) e estas associações com outros agentes patogenicos podem gerar perda de peso, claudicacao, edema das articulações de membros pélvicos e alta mortalidade em aves de cativeiro (ANTUNES et al., 2008).

Apesar das aves do presente estudo estarem infectadas com oocistos de *Isospora*, elas não demonstraram nenhuma dessas sintomatologias clínicas.

Devido à associação de infecções por *C. galli* e *Isospora* nas aves do presente estudo, não foi possível determinar qual foi o agente responsável pelas penas eriçadas e sujas de fezes observadas em duas das aves, uma vez que ambas infecções podem ocasionar as características observadas. Segundo Cox et al. (2001), em infecções mistas, a carga de um ou ambos os agentes infecciosos podem ser aumentados, um ou ambos podem ser suprimidos ou um pode ser aumentado e os outros suprimidos.

Passeriformes infectados por *C. galli* podem eliminar oocistos intermitentemente por 12-13 meses (ANTUNES et al., 2008; SILVA et al., 2010). A determinação de eliminação intermitente e prolongada de oocistos de *C. galli* em amostras fecais além de demonstrar que essa espécie causa infecção crônica em aves, também mantém a espécie presente entre gerações das aves pelo contato de genitores e progênie. Diante disso, se faz necessário a adoção de medidas rigorosas de manejo sanitário para prevenir a ocorrência de infecções em criatórios, estabelecimentos comerciais e ONGs que recebem aves silvestres de apreensão.

O isolado de *C. andersoni* de *S. flaveola* (Isolado 4b) se agrupou com os outros isolados da mesma espécie de estudos anteriores (MT648437 e KT175411) com alto suporte (80%) de bootstrap (Figura 2). O ramo da espécie *C. andersoni* se agrupou com os isolados de *C. galli* que também é um parasita gástrico sugerindo que essas duas espécies de *Cryptosporidium* são parentes próximos. *Cryptosporidium andersoni* é uma espécie encontrada principalmente em bovinos e humanos (CHALMERS e KATZER, 2013; RYAN et al., 2014) mas já foi relatada anteriormente na ave *Podargus strigoides* em um estudo australiano (NG et al., 2006) e em um avestruz *Struthio camelus* de um zoológico no sudoeste da França (OSMAN et al., 2017). Assim como relatado por Ng et al. (2006), não conseguimos determinar se a presença de oocistos de *C. andersoni* na amostra fecal das aves analisadas no presente estudo foi devido a uma infecção real ou a uma contaminação acidental por transporte mecânico, visto que as aves do presente estudo possuem estreito contato com humanos. Além disso, os animais também podem ser infectados indiretamente após a ingestão de água contaminada por *Cryptosporidium*. Diante do exposto, estudos são necessários para desvendar se aves são hospedeiras naturais ou apenas portadoras de *C. andersoni*, uma vez que estudos já relataram que uma espécie de

Cryptosporidium pode ter um alcance de hospedeiro mais amplo do que originalmente assumido (WIDMER e SULLIVAN, 2012).

Podemos concluir que alta carga parasitária de *C. galli* em todas as aves desta pesquisa determina que canário-da-terra, *S. flaveola*, é hospedeiro desta espécie de protozoário, embora este seja o terceiro relato de parasitismo nesta espécie de pássaro. Além disso, *S. flaveola* pode contribuir para a manutenção da infecção intraespecífica e interespecífica em ambientes com grande número de aves. Também podemos concluir que *C. andersoni* parasita *S. flaveola*, no entanto, a baixa prevalência em nossos estudos e os poucos relatos desta espécie de coccídeo em aves não permite inferir que esta espécie de passeriforme seja um bom hospedeiro ou se são apenas portadores do protozoário em ambientes com alta contaminação fecal.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa à T. K. S., Elizeu durante o desenvolvimento dessa pesquisa e também à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pela bolsa de Cientista do Nosso Estado (bolsa número 232568).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, K. W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. **In Pract**, v. 9, p. 47-49, 1987.

ANTUNES, R. G; SIMÕES, D. C; NAKAMURA, A. A; MEIRELES, M.V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Dis**, v. 52, n. 4, p. 5-702, 2008. DOI: 10.1637/8356-051208-Case.1. PMID: 19166068.

BERMUDEZ, A. J.; LEY, D. H.; LEVY, M. G.; BARNES, H. J.; GERIG, T. M. Experimental cryptosporidiosis in turkey poult. In: **Proceedings Meeting American Veterinary Medical Association**, Chicago, Annals, v. 124, p. 133, 1987.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol**, n. 29, p. 237-251, 2013.

ČONDLOVÁ, Š., HORČIČKOVÁ, M., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., HLÁSKOVÁ, L., KONEČNÝ, R., STANKO, M., MCEVOY, J., KVÁČ, M. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Apodemus spp. **European Journal of Protistology**, v. 63, p. 1-12, 2018.

COX, F. E. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitol**, v. 122, p. 23-38, 2001.

DE GRAAF, D.C., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L.M., ABBASSI, H., PEETERS, J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1269-1287, 1999.

FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2ed. RC, **Boca Raton**, p. 1-42.

HELMY, Y. A.; KRUCKEN, J.; ABDELWHAB, E. M., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., HAFEZ, H. M. Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for previously undetected parasite species. **PLoS One** **12**, 2017. Disponível em: e0177150, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0177150>. Acesso em: 03 de dezembro de 2021.

HOLUBOVÁ, N., TŮMOVÁ, L., SAK, B., HEJZLAROVÁ, A., KONEČNÝ, R., MCEVOY, J., KVÁČ, M. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. **Parasite Vectors**, v. 13, p. 1-17, 2020.

JEX, A.R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis, and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 304-317, 2008 PMID:18430539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.003>.

KHALIL, I.A., TROEGER, C., RAO, P.C., BLACKER, B.F., BROWN, A., BREWER, T.G., COLOMBARA, D. V., DE HOSTOS, E.L., ENGMANN, C., GUERRANT, R.L., HAQUE, R., HOUP, E.R., KANG, G., KORPE, P.S., KOTLOFF, K.L., LIMA, A.A.M., PETRI JR., W.A., PLATTS-MILLS, J.A., SHOULTZ, D. A., FOROUZANFAR, M.H., HAY, S.I., REINER, R.C JR, MOKDAD, A.H. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis study. **Lancet Glob**, v. 6, p. 758-768, 2018.

KIMURA, M.A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

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.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HOERR, F. J.; SMITH, P. C. Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 180-181, 1991

MÁCA, O.; PAVLÁSEK, I. *Cryptosporidium* infections of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) from an intensive artificial breeding programme in the Czech Republic. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1915-1922, 2016. PMID: 26815038. Doi: 10.1007/s00436-016-4933-5. Epub 2016 Jan 27.

NAKAMURA, A. A.; HOMEM, C. G.; SILVA, A. M.; MEIRELES, M. V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 15205, n. 1-2, p. 7-13, 2014. PMID: 25155280. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.07.033. Epub 2014 Aug 10.

NAKAMURA, A. A.; SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009. PMID: 19683397. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.07.033. Epub 2009 Jul 29.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7548-7553, 2006. <https://doi.org/10.1128/AEM.01352-06>.

NICHOLS, G. Epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press and IWA Publishing, **Boca Raton**, p. 79-118, 2008.

OSMAN, M.; SAFADI, D.; BENAMROUZ-VANNESTE, S.; CIAN, A.; MORINIERE, R.; GANTOIS, N.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; GUYOT, K.; BOSC, S.; CHABÉ, M.; PETIT, T.; VISCOGLIOSI, E.; CERTAD, G. Prevalence, transmission, and host specificity of *Cryptosporidium* spp. in various animal groups from two French zoos. **Parasitology Research**, v. 116, n. 12, p. 3419-3422, 2017. PMID: 29030716. DOI: 10.1007/s00436-017-5645-1. Epub 2017 Oct 13.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, v. 3, p. 290–301, 1999.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 40-336, 2011. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.04.003. Epub 2011 May 4. PMID: 21557938.

RYAN, U.M., FENG, Y., FAYER, R., XIAO, L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50year perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 51, p. 1099-1119, 2021.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, p. 667-1685, 2014.

RYAN, U.M., XIAO, L., READ, C., SULAIMAN, I.M., MONIS, P., LAL, A.A., FAYER, R., PAVLÁSEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Jounal Parasitol.** 89, 809-813, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTÍN, M., J. M. TROUT, L. XIAO, L. ZHOU, E. GREINER, AND R. FAYER. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 103–117, 2004.

SILVA, D. C.; HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; TEIXEIRA, W. F.; PERRI, S. H.; MEIRELES, M. V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitol Res Research**, v. 107, n. 2, p. 7-271, 2010 doi: 10.1007/s00436-010-1858-2. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20407911.

SEVÁ, A. A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA S. D. E. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium spp.* from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. (1-2), p. 27-32, 2011. Doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.031. Epub 2010 Oct 7. PMID: 21035268.

ZHA, H.B., JIANG, J.S. Life cycle of *Cryptosporidium meleagridis* in quails. **Acta Scientiae Veterinariae**, v 25, p. 273-278, 1994.

WANG, Y., ZHANG, K., CHEN, Y., LI, X., ZHANG, L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in wild birds: A One Health perspective. **Parasitology Resarch**, v 120, p. 3035-3044, 2021.

WANG, R., ZHAO, G., GONG, Y., ZHANG, L. Advances and perspectives on the epidemiology of bovine *Cryptosporidium* in China in the past 30 years. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-6, 2017.

WIDMER, G.; SULLIVAN, S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 61-71, 2012.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 72–97, 2004.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters using a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 54926-55498, 2000.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

ANEXO IV

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade



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: 78016-1	Data da Emissão: 14/04/2021 15:59:13	Data da Revalidação*: 14/04/2022
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: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira	CPF: 547.278.047-00
Título do Projeto: COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO DA TERRA, <i>Sicalis flaveola</i> , DE VIDA SILVESTRE E CRIADOS EM CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão de Literatura	04/2021	03/2025
2	Coleta de Fezes das aves cativas	04/2021	03/2025
3	Coleta de fezes das aves de vida livre	04/2021	03/2025
4	Processamento das Amostras Fecais	04/2021	03/2025
5	Tabulação dos Dados e Análise Estatística	01/2023	03/2025

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Samira Salim Mello Gallo	Pesquisadora	101.858.147-27	Brasileira
2	Taynara Kerolayne Santos Elizeu	Pesquisadora	020.947.326-65	Brasileira
3	NICOLE BRAND EDERLI	Pesquisadora	087.409.467-46	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: 0780160120210414

Página 1/5



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: 78016-1	Data da Emissão: 14/04/2021 15:59:13	Data da Revalidação*: 14/04/2022
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: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira	CPF: 547.278.047-00
Título do Projeto: COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO DA TERRA, Sicalis flaveola, DE VIDA SILVESTRE E CRIADOS EM CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

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	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.
4	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.
5	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.
6	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.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
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 .
9	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.

Outras ressalvas

1	1. 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. 2. O número máximo de redes armadas não deve ultrapassar 10 unidades para cada vistoriador experiente presente.	CEMAVE Cabedelo-PB
---	--	--------------------

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: 0780160120210414

Página 2/5



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: 78016-1	Data da Emissão: 14/04/2021 15:59:13	Data da Revalidação*: 14/04/2022
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: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira	CPF: 547.278.047-00
Título do Projeto: COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO DA TERRA, Sicalis flaveola, DE VIDA SILVESTRE E CRIADOS EM CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Cidade e zona rural	Cabo Frio-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
2	Cidade e zona rural	Santo Antônio de Pádua-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
3	Cidade e zona rural	Itaperuna-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
4	Cidade e zona rural	Muriaé-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
5	Cidade e zona rural	Laje do Muriaé-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
6	Cidade e zona rural	Campos dos Goytacazes-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
7	Cidade e zona rural	Eugenópolis-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

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

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.

Materiais e Métodos

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

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: 0780160120210414

Página 3/5



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: 78016-1	Data da Emissão: 14/04/2021 15:59:13	Data da Revalidação*: 14/04/2022
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: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira	CPF: 547.278.047-00
Título do Projeto: COCCÍDIOS PARASITAS DE CANÁRIO DA TERRA, <i>Sicalis flaveola</i> , DE VIDA SILVESTRE E CRIADOS EM CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	CNPJ: 04.809.688/0001-06

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO	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: 0780160120210414

Página 4/5

