

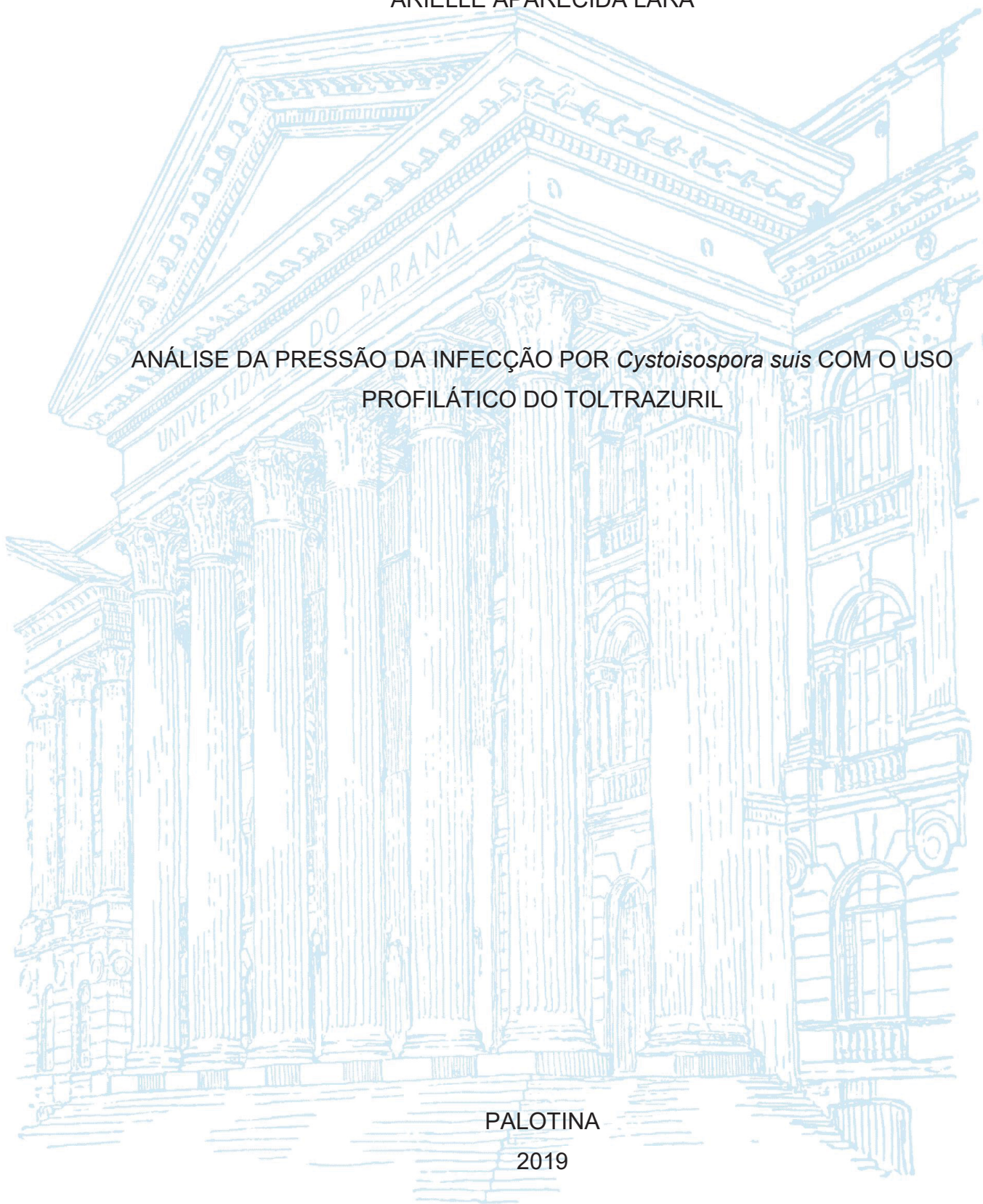
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARIELLE APARECIDA LARA

ANÁLISE DA PRESSÃO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora suis* COM O USO
PROFILÁTICO DO TOLTRAZURIL

PALOTINA

2019



ARIELLE APARECIDA LARA

ANÁLISE DA PRESSÃO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora suis* COM O USO
PROFILÁTICO DO TOLTRAZURIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Saúde Animal, Linha de Pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L318 Lara, Arielle Aparecida
Análise da pressão da infecção por *Cystoisospora suis* com o uso profilático do toltrazuril / Arielle Aparecida Lara. – Palotina, 2019.
92f.

Orientadora: Silvia Cristina Osaki
Coorientador: Geraldo Camilo Alberton
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Leitões. 2. PCR. 3. Toltrazuril. I. Osaki, Silvia Cristina. II. Alberton, Geraldo Camilo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

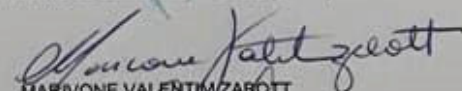
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ARIELLE APARECIDA LARA** intitulada: **ANÁLISE DA PRESSÃO DE INFECÇÃO DE *Cystoisospora suis* COM O USO PROFILÁTICO DO TOLTRAZURIL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovada no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

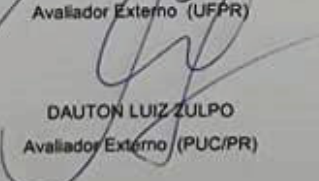
PALOTINA, 26 de Abril de 2019.


SILVIA CRISTINA OSAKI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARIVONE VALENTIM ZABOTT

Avaliador Externo (UFPR)


DAUTON LUIZ ZULPO

Avaliador Externo (PUC/PR)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Arielle Aparecida Lara, filha de Nivaldo Evangelista Lara e Solange Aparecida de Souza Lara, nascida em 26 de fevereiro de 1991, no município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Médica Veterinária formada no ano de 2015 pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Residente em Doenças Infecciosas e Parasitárias dos Animais no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2015-2017). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa em Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado me ajudando a seguir em frente e me dando forças e saúde para perseverar em meus ideais.

Aos meus pais, por serem os melhores do mundo, sempre me apoiando em minhas escolhas, sendo a minha base, o meu suporte, me oferecendo todo amor do mundo sem pedir nada em troca.

À minha orientadora professora Silvia, juntas desde 2011 por meio de projetos de extensão, estágios, residência e agora no mestrado. Sempre compreensiva, paciente, com uma palavra amiga e confortante. Atuando como uma mãe que leva sopa quentinha para seu filho em uma sexta-feira à noite, e uma mãe que te abraça e te conforta dizendo que tudo vai dar certo. Agradeço a paciência, o carinho, as conversas, o apoio, as risadas e por todo aprendizado.

Agradeço ao meu co-orientador professor Geraldo Camilo Alberton, pela prestatividade durante todo o mestrado, o auxílio na hora do desenvolvimento do projeto, pela paciência e dedicação.

Agradeço à minha querida amiga Ana Paula, pela amizade que foi essencial durante esses dois anos, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, por toda ajuda durante o projeto, desde as coletas até todas as etapas de processamento das amostras.

Agradeço à minha querida amiga Alessandra Snak, que mesmo de longe, se fez tão presente, o que não poderia ser diferente. Através de seus conselhos, trocas de experiências, ajuda, desabafo. Por tudo! Que foi essencial durante todo o projeto.

Agradeço ao Ricardo Babinski Bregonde e Vinicius Dahm por toda ajuda e suporte fornecido durante o projeto, pelos momentos de descontração, pelas conversas, risadas, por todo trabalho feito juntos. Agradeço também à Daniela Lorencena, pela ajuda durante as PCR, pelas conversas, risadas e trocas de experiências. Agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma na realização do projeto, Wellyton Carlos, Emanuelle Ricini, Juliana Anzolim, Heloisa Lacerda, que disponibilizaram seu tempo para me auxiliar durante as exaustantes coletas.

Agradeço ao meu namorado por todo apoio durante esse período, por ter tornado tudo tão mais leve.

Agradeço ao Luciano Miotto por permitir o desenvolvimento de meu projeto em sua granja e a todos os colaboradores da granja que foram muito receptivos e dispostos a colaborar no que fosse necessário.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias e de Parasitologia Veterinária por todo o suporte na realização dos exames coproparasitológicos. Às professoras Luciana Grange e Adriana Fiorini por permitir a utilização do laboratório, principalmente para as leituras das eletroforeses.

Agradeço ao professor Alexandre Leseur pela ajuda com as análises estatísticas, interpretação dos dados coletados e pela paciência em fazer a análise comigo.

Por fim, agradeço à CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante todo o período do mestrado.

A todos, meu sincero muito obrigada!

“Haverá dias de sol e bonança, e outros de chuvas e tempestades. Haverá sorrisos e alegrias, e choros e perturbações. Mas após a escuridão da noite, sempre surgirá o sol da manhã”

Chico Xavier

RESUMO

A diarreia nas granjas suinícolas constitui um problema que resulta em morbidade e mortalidade dos animais, provocando perdas econômicas na produção. A enfermidade pode ter causas multifatoriais, sendo os coccídios agentes importantes, associado a um manejo inadequado. O tratamento normalmente é baseado no uso preventivo de um fármaco com ação anticoccidiana e antiprotozoária, sem se conhecer efetivamente a necessidade de utilização dessas drogas, uma vez que raramente são feitos exames coproparasitológicos comprovando a infecção por esses parasitos. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de *Cystoisospora suis* em leitões e matrizes, as vias de transmissão e fonte de infecção do parasito e a necessidade de utilização de drogas anticoccidianas com uso preventivo, e ainda observar a influência da estação do ano na ocorrência da parasitose. O trabalho foi realizado em uma granja de suínos localizada na cidade de Palotina-PR, em duas etapas, sendo a primeira no inverno e a segunda no verão. Em cada estação foram utilizadas duas salas de maternidade com nove matrizes em cada, sendo uma sala o grupo controle e a outra o grupo tratado, onde se utilizou o toltrazuril no 5º dia de vida dos leitões. As seguintes amostras foram coletadas: fezes de matrizes no dia do alojamento, no dia do nascimento dos leitões (dia 0) e nos dias 7, 14 e 21; água dos bebedouros individuais das gaiolas; *swabs* retais das leitegadas no dia do nascimento ambas com a mesma periodicidade relatada anteriormente, totalizando 72 coletas para cada estação; insetos e roedores que tivessem possível contato com as salas analisadas; resíduos de fezes e matéria orgânica contidos nos calçados dos tratadores que tivessem contato com as salas; *swabs* de superfície do ambiente, no pré e pós alojamento; e resíduos de fezes que ficavam acumulados nas gaiolas durante o alojamento. As amostras foram submetidas às técnicas de Willis-Mollay e Sheather e PCR para detecção de *C. suis*. Após o experimento do inverno foi solicitada a retirada do toltrazuril para verificar a influência do medicamento na ocorrência do coccídio. Durante o exame coproparasitológico foi observada uma baixa ocorrência de *C. suis* nas amostras de fezes das matrizes (2,84%). Na PCR nenhuma destas amostras resultou positiva. Das 183 amostras de fezes acumuladas nos ambientes, 37 resultaram positivas na técnica de Willis-Mollay, e nos leitões, a positividade foi de 9,03% na PCR. Todas as amostras de *swabs* de superfície ambiental, resíduos de fezes e material orgânico no calçado dos tratadores e os insetos coletados foram negativos na PCR. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado. Todas as amostras positivas de leitões ocorreram durante o inverno. Nenhuma das categorias analisadas mostrou correlação com as leitegadas, nesse caso diante dos resultados não foi observada nenhuma fonte de infecção ou via de transmissão da coccidiose para os leitões. Os resultados demonstraram que apesar da retirada do medicamento, a infecção por *C. suis* foi reduzida, comprovando que a utilização da droga de forma preventiva muitas vezes não é necessária e que um acompanhamento utilizando métodos coproparasitológicos, é possível e mais indicado.

Palavras-chave: leitões, PCR, toltrazuril, *C. suis*.

ABSTRACT

Diarrhea in pig farms represents a problem that results in animal morbidity and mortality, causing economic losses in production. The disease can have multifactorial causes, being the main agents important, associated to an inadequate management. The treatment is usually based on the use of anticancer and antiprotozoal drugs, with the purpose of preventing the occurrence of drugs, at the same time as coproparasite tests of infection by these parasites are performed. The objective of this work was to verify the occurrence of spiny cystitis in cells and matrices, as transmission routes and source of infection of the parasite and use of anticoccidials with the preventive use, and to observe the intensity of the activity of the year in the incidence of parasitosis. The work was carried out in a farm located in the city of Palotina-PR, in two stages, one in winter and the second in summer. In each row, two maternity rooms were used, with nine matrices in each, being one control group and one treated group, where toltrazuril was used in the fifth day of life of the piglets. The following samples were collected: feces from matrices on the day of lodging and on the day of birth of the piglets (day 0) and days 7, 14 and 21; water from drinking fountains individuals from seagulls; rectal swabs of litters on the following day, with the same periodicity previously reported, totaling 72 collections for each season; insects and rodents that could have contact with the analyzed rooms; residues of matter and organic matter contained in the shoes of the handlers who had contact with the rooms; surface swabs in the pre and post accommodation; and waste stool that accumulates in the cages during housing. The samples were submitted to the techniques of Willis-Mollay and Sheather and PCR for *C.suis* detection. After the winter experiment, toltrazuril was withdrawn to verify the influence of the virus on the incidence of coccidia. During the coproparasitary examination the incidence of feces from the matrices was analyzed (2.84%). The membranes were removed positively. Of the 183 samples of samples accumulated in the environments, 37 resulted in the Willis-Mollay technique, and in the piglets, with a positivity of 9.03% in the PCR. All samples of environmental surface swabs, faeces residues and organic materials were not treated and the insects were negative in PCR. Not a significant difference between the treated and untreated group. All positive piglet samples occurred during the winter. Other from the rules analyzed in the case of the piglets, in the case of the results in the case of the presence of the source of infected or via transmission of the coccidiosis to the piglets. The results demonstrated that the effectiveness of the withdrawal of the drug, *C. suis* infection was reduced, proving that the drug is used preventively, and it is not necessary to perform a coproparasitological alert, it is possible and more indicated.

Key-words: piglets, PCR, toltrazuril, Willis-Mollay.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

FIGURA 1 - OOCISTOS DE <i>C. suis</i> OBSERVADOS SOB MICROSCOPIA ÓPTICA (aumento 400x)	16
FIGURA 2 - CICLO DE VIDA <i>C. suis</i>	17
FIGURA 3 - LEITÃO COM DIARREIA SUGESTIVA DE COCCIDIOSE	20

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE COCCÍDIOS EM SUÍNOS EM DIFERENTES PAÍSES, MÉTODO DIAGNÓSTICO, NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E REFERÊNCIAS.	25
--	----

CAPÍTULO 1:

TABELA 1 - COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	43
TABELA 2 - RESULTADOS DA PCR DE FEZES DE LEITÕES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE <i>C. suis</i> EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.....	49
TABELA 3 - RESULTADOS DOS EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E MOLECULAR DE FEZES DE MATRIZES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE COCCÍDIOS EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.	52
TABELA 4 - RESULTADOS DOS EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E MOLECULAR DE FEZES DE GAIOLAS DE MATRIZES E DE LEITÕES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE COCCÍDIOS EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.	53
TABELA 5 - RESULTADOS DA PCR DE ÁGUA DOS BEBEDOUROS INDIVIDUAIS DAS GAIOLAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE <i>C. suis</i> EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
µL	– Microlitro
µm	– Micrômetro
NaCl	– Cloreto de Sódio
°C	– grau Celsius
X	– Vezes
pmol	– Picomol
sp	– espécie
GoTaq	– DNA polimerase estável fornecida em uma formulação própria
<i>C. suis</i>	– <i>Cystoisospora suis</i>
UR	– Umidade Relativa do Ar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	SUINOCULTURA E OS DESAFIOS COM A SÍNDROME DE DIARREIA NOS ANIMAIS	13
2.2	CYSTOISOSPORA SPP.	14
2.2.1	<i>Cystoisospora suis</i>	15
2.3	ESTRUTURA E CICLO BIOLÓGICO	15
2.4	FONTE DE INFECÇÃO	18
2.5	SINAIS CLÍNICOS	19
2.6	DIAGNÓSTICO	21
2.7	TRATAMENTO E CONTROLE	23
2.8	DISTRUBUIÇÃO	24
3	REFERÊNCIAS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5	CAPÍTULO 1	35
5.1	Introdução	38
5.2	Material e Métodos	40
5.2.1	Comitê de Ética em Experimentação Animal	40
5.2.2	Área de Estudo	40
5.2.3	Período Experimental	42
5.2.4	Coleta e Processamento de Amostras	42
5.3	Resultados e discussão	49
5.3.2	<i>Swabs</i> retais (leitões)	49
5.3.1	Matrizes	52
5.3.3	Ambiente	53
5.3.4	Água dos Bebedouros	55
5.3.5	Moscas e baratas	57
5.3.6	Calçado dos Tratadores	57
5.3.7	<i>Swabs</i> pré alojamento e pós limpeza e desinfecção	57
5.4	Conclusão	61
5.5	Referências – Capítulo 1	62
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7	REFERÊNCIAS	67
8	APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com 3,3 milhões de toneladas produzidas anualmente, sendo 600 mil toneladas destinadas à exportação para 70 países (ABPA, 2019), possuindo um dos maiores rebanhos de suínos do mundo, constituído por animais de diversas raças destinadas principalmente à produção industrial (NISHI et al., 2000). A região Sul concentra grande parte da atividade suinícola do país, onde encontram-se empresas tecnificadas e com processo de modernização tecnológica com foco no melhoramento genético, sanidade, alimentação, e manejo do plantel (ESPÍNDOLA, 2002).

Apesar dos avanços nas tecnologias e melhorias nas condições de manejo, os parasitas ainda constituem um problema para a produção de suínos, persistindo mesmo em locais com boas práticas de manejo. Além de alterar o desempenho dos animais, conduzem a perdas econômicas para o setor, e em casos de infecções maciças, pode ocorrer mortalidade principalmente em animais jovens (MOTA et al., 2003; PIGI, 2007). Os prejuízos devidos à ocorrência de parasitas nas instalações dependem da quantidade dos mesmos no ambiente, da susceptibilidade individual de cada animal e do plantel, e as condições higiênicas-sanitárias adotadas na granja. Diante disso, faz-se necessário conhecer a epidemiologia das espécies que acometem os animais, bem como entender a dinâmica de infecção dos parasitas, a disponibilidade dos ovos, larvas, cistos e oocistos nos ambientes, e a detecção das fontes de infecção (JESUS e MÜLLER, 2000; MOTA et al., 2003; KNECHT et al., 2011).

Poucos têm sido os estudos referentes à infecção por helmintos e coccídios em suínos no Brasil, principalmente os relacionados à frequência e à epidemiologia dos parasitas gastrintestinais (d'ALENCAR et al., 2006). Estudos que relatam os efeitos das práticas de manejo, de higiene, do vazio sanitário da sala de maternidade, e a estrutura das instalações da granja no risco de ocorrência e transmissão da doença, também são pouco frequentes (MUNDT et al., 2005; SOTIRAKI et al., 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUINOCULTURA E OS DESAFIOS COM A SÍNDROME DE DIARREIA NOS ANIMAIS

A cada ano, a suinocultura vem objetivando o aprimoramento das tecnologias visando suprir a crescente demanda do mercado e o consumo da carne suína. Parâmetros produtivos e reprodutivos são frequentemente analisados e melhorados para aumentar a produção e reduzir os custos das granjas produtoras de suínos (ALMEIDA, 2003).

Práticas de manejo adequado nas granjas vêm aumentando o desempenho reprodutivo e reduzindo a mortalidade nos animais, favorecendo assim o crescimento da produção. O manejo sanitário destinado aos animais inclui monitoramento clínico e laboratorial, para prevenir, tratar e controlar possíveis doenças, e o manejo sanitário destinado ao ambiente, incluindo o controle da qualidade do ar, temperatura e ventilação, controle de moscas, roedores e outros animais carreadores de agentes causadores de doenças (SOBESTIANSKY et al., 1998). Diante da intensificação da produção de suínos, melhorias nas condições higiênicas sanitárias estão sendo aplicadas reduzindo o contato dos animais com as possíveis fontes de infecção, pela utilização de práticas como desmame precoce, separação dos animais por idade, quarentena de animais ingressantes na instalação e o sistema “todos-dentro-todos-fora”. O correto manejo das instalações por meio de uso de piso adequado, limpeza rotineira dos equipamentos e estabelecimento, também tem contribuído para evitar o contato dos animais com agentes infecciosos e parasitários. O contato de espécies de animais com os suínos, nos quais esses podem atuar como hospedeiros intermediários, tem sido cada vez mais reduzido pelo uso de práticas de manejo e instalações que dificultam a aproximação dos hospedeiros aos animais das granjas. A associação destes fatores contribui para redução nas espécies parasitárias e a quebra do ciclo de vida dos parasitas presentes nos ambientes das granjas (MORA, 2000).

Um manejo incorreto ou precário, associado a alterações ambientais, fatores nutricionais e fisiológicos e uma grande carga de agentes etiológicos somados, irão contribuir para o aparecimento da síndrome de diarreia nos suínos (GREGORI et al., 2000).

A síndrome de diarreia nos leitões constitui um dos maiores problemas de saúde que afetam as granjas suinícolas. As infecções entéricas tornaram-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade em leitões recém-nascidos, resultando em perdas econômicas especialmente quando a amamentação e o desmame são afetados (ZLOTOWSKI et al., 2008). Dentre os diversos agentes patogênicos possíveis causadores de quadros de diarreia, destacam-se *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., rotavírus grupo A (RV-A), coronavírus bem como por nematódeos e protozoários (ZIMMERMAN et al., 2012).

O manejo dos suínos irá interferir na carga e diversidade parasitária de helmintos e protozoários e na intensidade das infecções que os acometem, fazendo-se necessário oferecer condições de higiene sanitária e manejo adequadas. As infecções provocadas pelo parasitismo nem sempre provocam alterações visíveis nos animais, mas podem afetar o desenvolvimento, provocando emagrecimento, retardo do crescimento e mortalidade, além dos custos gerados para o tratamento desses animais (JESUS e MULLER, 2000; PINTO et al., 2007). Os protozoários têm sido observados em suínos, principalmente os coccídios, que provocam quadros diarreicos intensos em leitões lactentes (PINTO et al., 2007).

2.2 *Cystoisospora* spp.

O gênero *Cystoisospora* era inicialmente conhecido como *Isospora*, descrito por Schneider em 1881, porém havia controvérsia sobre sua taxonomia desde os primórdios. Em 1977 Frankel propôs o gênero *Cystoisospora*, devido à descoberta da capacidade de *I. felis* e *I. rivolta* formarem cistos monozoicos em hospedeiros paratênicos, principalmente nos linfonodos mesentéricos de roedores (DUBEY & FRENKEL, 1972; FRENKEL & DUBEY, 1972; DUBEY, 1979). A partir disso, as espécies de *Isospora* spp. que formavam cistos foram denominadas *Cystoisospora* spp. (FRENKEL, 1977).

Este novo gênero foi inicialmente englobado na família Eimeriidae, pois seu ciclo de vida era semelhante aos das espécies pertencentes a essa família (LEVINE, 1988), porém por meio de análises filogenéticas do gene rRNA 18S, observou-se que o gênero *Cystoisospora* era mais próximo dos gêneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Sarcocystis* do que do gênero *Eimeria*, indicando que *Cystoisospora*

deveria ser incluído na família Sarcocistidae, juntamente com outros coccídios formadores de cistos (CARRENO et al., 1998; FRANZEN et al., 2000; SAMARASINGHE et al., 2008). Estudos baseados em dados moleculares e morfológicos permitiram dividir o grupo parafilético *Isospora* em dois grupos monofiléticos de parasitas, o *Isospora* e o *Cystoisospora*. Oocistos que apresentam corpos de Stieda em seus esporocistos, possuem ciclo de vida monoxeno e não são formadores de cistos pertencem ao gênero *Isospora*, família Eimeriidae sendo descritos principalmente em fezes de aves. Já oocistos sem a estrutura morfológica corpo de Stieda com fraturas nos esporocistos, possuem ciclo de vida heteroxeno, sendo formadores de cistos pertencem ao gênero *Cystoisospora* família Sarcocystidae. Neste gênero, além das espécies já inclusas como a *C. felis* e *C. rivolta* do gato e *C. canis* e *C. ohioensis* do cão, foram acrescentadas as espécies *C. belli*, antiga *I. belli* do homem e *C. suis*, antiga *I. suis* de suínos (WENYON, 1923; FRENKEL & SMITH, 2003; BARTA et al., 2005; SAMARASINGHE et al., 2008).

2.2.1 *Cystoisospora suis*

C. suis é um dos mais prevalentes parasitas encontrados na suinocultura intensiva, levando a perdas econômicas significativas por causar, em leitões lactentes, quadros de diarreia transitória e desidratação, com subsequente diminuição no ganho de peso e queda no desempenho (STUART et al., 1980; STUART & LINDSAY, 1986; MUNDT et al., 2007; LEYTON et al., 2011).

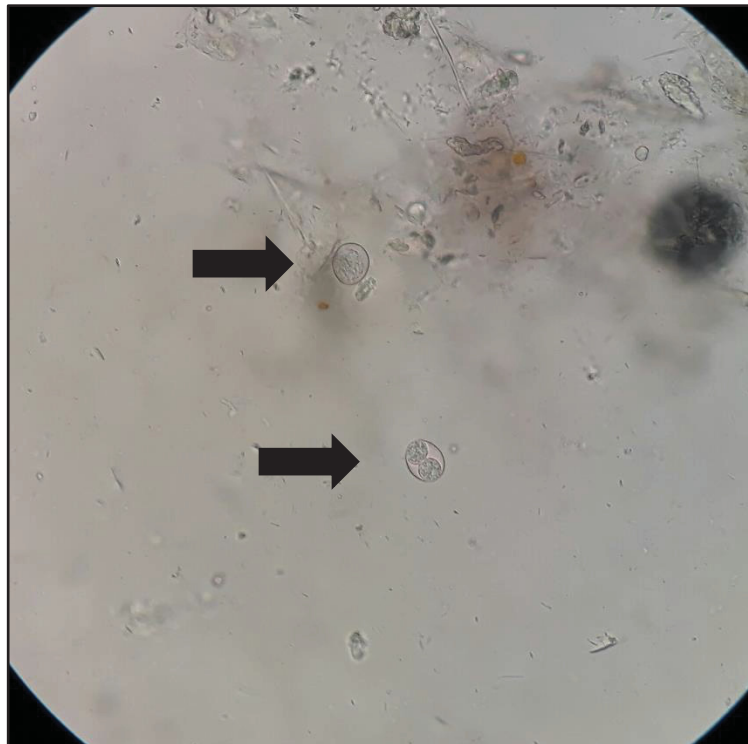
Sobestiansky, et al. (2012) afirmam que embora a coccidiose seja uma doença comum em leitões na fase de maternidade, nos últimos anos, devido ao desmame realizado precocemente (antes dos 28 dias de idade) em algumas granjas, a enfermidade tem sido observada também no início da fase de creche.

2.3 ESTRUTURA E CICLO BIOLÓGICO

Cystoisospora suis é um parasita intracelular obrigatório, heteroxeno facultativo e seu ciclo de vida pode ser dividido em três fases distintas: esporogonia, excitação e desenvolvimento endógeno (TAYLOR et al., 2010; SOBESTIANSKY et al., 1998).

Ao ser eliminado no ambiente juntamente com as fezes, o oocisto não infectante (imaturo) passa pela fase de esporogonia, processo pelo qual este, sob condições de temperatura (24 a 27°C), oxigenação e umidade (80-85%), passa a ser infectante (esporulado), num período aproximado de 48 horas. Esta fase (esporulação) irá produzir, no interior do oocisto, dois esporocistos, sendo que cada um deste irá conter quatro esporozoítos. Os oocistos (FIGURA 01) possuem formato esférico a subesférico, medindo cerca de 20,6 x 18,1µm, com uma membrana celular incolor e fina. Os dois esporocistos são elipsoides e medem 13-14 x 8-11µm sem corpúsculo Stieda. Os quatro esporozoítos, presentes em cada esporocisto, têm formato alongado, cilíndrico com uma extremidade pontiaguda (TAYLOR et al., 2010; SOBESTIANSKY et al., 1998).

FIGURA 1 - OOCISTOS DE *C. suis* OBSERVADOS SOB MICROSCOPIA ÓPTICA (aumento 400x)



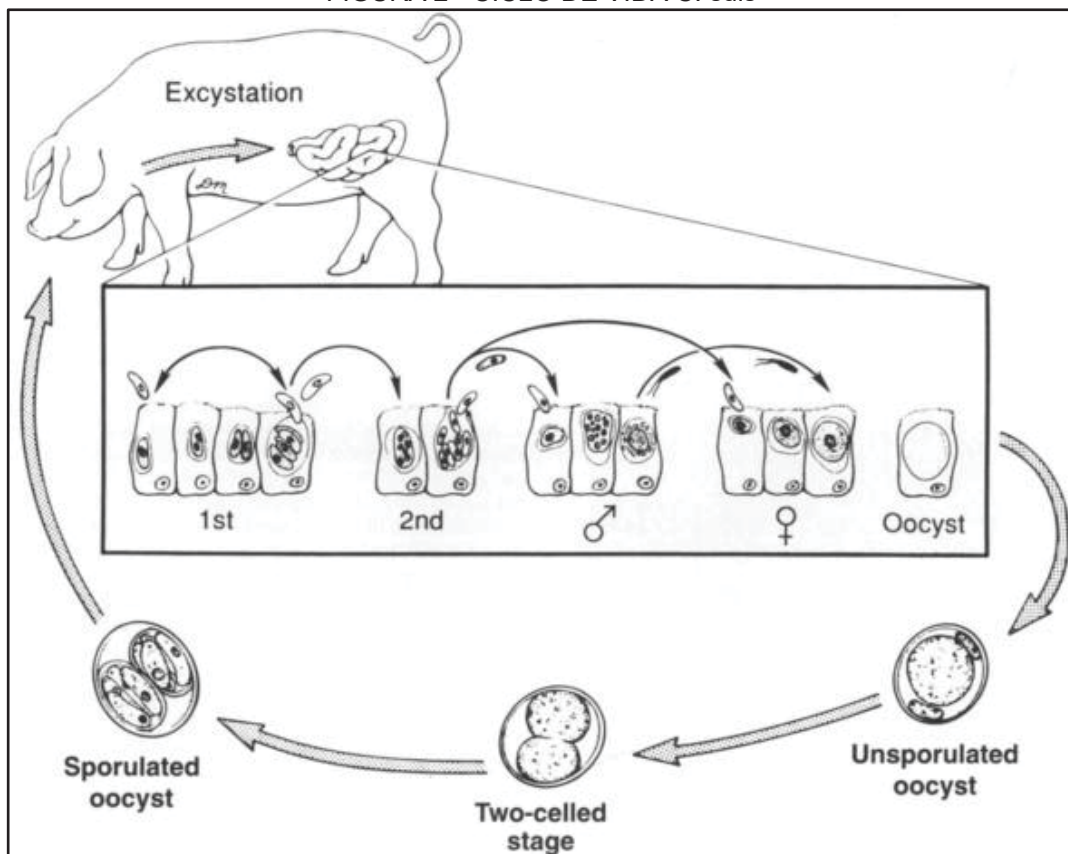
FONTE: A Autora (2018).

O suíno se infecta ao ingerir estes oocistos esporulados presentes no ambiente. A passagem pelo estômago altera a parede do oocisto, permitindo que os sais biliares e enzimas digestivas rompam a parede do oocisto e do esporocisto, liberando assim os esporozoítos no lúmen intestinal, compreendendo a fase de excitação (SOBESTIANSKY et al., 1998). Esses esporozoítos penetram nos

enterócitos iniciando a etapa de desenvolvimento endógeno, arredondando-se sob a forma de trofozoítos, aumentando de tamanho e formando a primeira geração de esquizontes. Estes esquizontes, dão origem à primeira geração de merozoítos, que invadem células sadias para originar a segunda geração de esquizontes. A merogonia continua por uma a três gerações (BOWMAN, 2010).

O merozoíto produzido no final da esquizogonia, chamado de telomerozoíto, penetra em uma célula sadia e se desenvolve em microgametócito (masculino) e macrogametócito (feminino). Estes irão se desenvolver e dar origem aos microgametas e macrogametas. Apenas uma pequena parte destes microgametas formados conseguirá fertilizar os macrogametas formando assim o zigoto, que dará origem, após coalescência de grânulos hialinos em sua periferia, ao oocisto, sendo essa chamada de reprodução sexuada (FIGURA 02) (BOWMAN, 2010).

FIGURA 2 - CICLO DE VIDA *C. suis*



FONTE: Lindsay et al. (1994).

A fase intrainestinal do ciclo de vida acontece entre cinco a oito dias ocorrendo principalmente, no jejuno e íleo e, em casos de altas infecções pode ocorrer no ceco e cólon (SOBESTIANSKY et al., 2012).

De acordo com Joachim e Schwarz (2015), *C. suis* tem um desenvolvimento consideravelmente rápido, principalmente quando comparado ao gênero *Eimeria* que também pode estar presente nos suínos. O processo que engloba o momento da infecção até a conclusão da esporulação, tornando-se infectante, necessita de menos de uma semana para se completar.

2.4 FONTE DE INFECÇÃO

A epidemiologia de *C. suis* ainda não está totalmente elucidada. Estudos pretéritos indicavam que as matrizes desempenhavam o papel de fonte de infecção para os leitões, porém alguns autores demonstraram que as matrizes não excretam, ou raramente excretam, oocistos de *C. suis* (LINHARES et al., 2012), não desempenhando assim um papel importante na transmissão de *C. suis* para a leitegada (SOTIRAKI et al., 2008).

De acordo com Sobestianky, et al. (1998) os disseminadores de *C. suis* são leitegadas anteriores que eliminam oocistos no ambiente e permanecem no piso da maternidade. Estes oocistos presentes no ambiente das gaiolas da maternidade, são ingeridos pela nova leitegada constituindo-se uma importante via de transmissão para os leitões. Os oocistos podem ser remanescentes de leitegadas anteriores ou serem carregados de um ambiente para outra por meio de insetos, roedores ou pelos funcionários (SOTIRAKI et al., 2008; LINHARES et al., 2012). Na maioria das granjas o período de vazio sanitário é muito pequeno ou muitas vezes inexistente, a possibilidade de contaminação entre leitegadas é muito grande, tornando assim o ambiente uma via de transmissão importante para os animais (LINDSAY et al., 2005). Esta contaminação é facilitada pela grande excreção de oocistos (1000 a 40000 oocistos/grama de fezes) pelos animais portadores (SOTIRAKI et al., 2008).

A infecção dos leitões pode acontecer em qualquer momento durante a fase de maternidade, podendo ocorrer logo após o parto ou próximo da desmama. Existe um padrão cíclico de excreção dos oocistos, apresentando dois picos, um com 12 dias pós nascimento e o outro com 20, demonstrando que nem todos os animais da leitegada vão se infectar ao mesmo tempo, sendo que os oocistos liberados no primeiro pico de excreção aumentam a pressão de infecção da gaiola de maternidade, favorecendo assim a contaminação dos leitões que ainda não haviam sido contaminados (SOTIRAKI et al., 2008). Joachim et al. (2014) observaram, após

inoculação experimental de oocistos esporulados, que os leitões começavam a excretar os oocistos, em média, com seis dias pós infecção, aumentando a quantidade excretada até o 8º dia. Um segundo pico de excreção foi observado do 12º ao 16º dia pós infecção.

Os oocistos são bastante resistentes no ambiente, podendo sobreviver no solo por mais de um ano em temperatura de 40 a 45°C. Este fato dificulta o controle e erradicação da coccidiose nas granjas, mesmo com as técnicas de manejo, limpeza e desinfecção na suinocultura atual (LINHARES et al., 2012).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Leitões infectados com *C. suis* apresentam um quadro clínico de diarreia amarelada a acinzentada fétida e pastosa, ocorrendo entre cinco a 15 dias de idade (FIGURA 03) (LINDSAY et al., 1985; MEYER et al., 1999; SOBESTIANSKY et al., 1998). A diarreia pode persistir por 10 a 15 dias e geralmente não responde à antibioticoterapia. A enfermidade afeta tanto leitegada de primíparas como leitegada de múltiparas, sendo que a gravidade dos sinais clínicos depende da idade em que o animal foi infectado, e se há infecção mista com outros agentes infecciosos (SOTIRAKI et al., 2008).

Leitões lactentes infectados durante a primeira semana de vida desenvolvem as lesões intestinais típicas e os sinais clínicos da coccidiose, provocando assim, uma infecção mais severa nestes animais (MUNDT et al., 2003; WORLICZEK et al., 2009; WORLICZEK et al., 2011). Segundo Gabner et al. (2014) isso pode ser devido a uma imaturidade funcional do sistema imunológico dos leitões durante as primeiras semanas de vida.

FIGURA 3 - LEITÃO COM DIARREIA SUGESTIVA DE COCCIDIOSE



FONTE: A Autora (2018).

A taxa de morbidade da doença é variável, podendo atingir 100%, em comparação à taxa de letalidade, que geralmente é menor que 5%. Porém há uma marcante redução no desempenho dos animais, levando a perdas econômicas. Em casos mais graves, a letalidade da doença pode atingir até 20% (SOBESTIANSKY et al., 1998). Animais acometidos por *C. suis* ficam com a região do períneo suja de fezes, pelos arrepiados e os leitões ficam mais letárgicos, porém continuam a se alimentar. Leitões altamente infectados terão uma perda de parte da superfície intestinal, levando assim a uma redução no crescimento e ganho de peso, tornando umas das consequências mais marcantes da coccidiose (KREINER et al., 2011).

C. suis é considerado agente primário e responsável pela lesão na mucosa intestinal, permitindo a ocorrência de infecções secundárias. As lesões primárias causadas por *C. suis* tornam a mucosa intestinal mais permeável a outros patógenos (BACH et al., 2003).

A coinfeção com outros agentes, como bactérias (*E.coli*, *Clostridium* sp.) e vírus (Rotavírus, Coronavírus) pode estar associada a quadros clínicos mais graves e

taxas de letalidade mais elevadas, quando comparadas à infecção somente pelo referido protozoário (VITOVEC et al., 1991; WESTPHAL et al. 2007; MENGEL et al., 2012).

Após a ingestão de oocistos esporulados, a infecção se desenvolve por um período de cinco a sete dias resultando em lesões no epitélio das vilosidades intestinais, como necrose, fusão das vilosidades, atrofia e hiperplasia das criptas e enterite necrótica (MUNDT et al., 2003). Estas lesões causadas por *C. suis* localizam-se basicamente no jejuno e íleo, e algumas vezes se estendendo ao ceco e cólon (NIESTRATH et al., 2002), podendo predispor os leitões a outras infecções como clostridioses e colibacilose (MAES et al., 2007). Macroscopicamente, as alterações são discretas e dificilmente pode ser encontrada uma enterite fibrinonecrótica (NIESTRATH et al., 2002). As lesões consistem em atrofia de vilosidades e moderada erosão da mucosa, a uma grave enterite fibrinonecrótica (STUART et al., 1982; MUNDT et al., 2007).

As lesões no intestino podem ter um impacto significativo no crescimento e no bem-estar dos suínos ao longo da vida, causando queda no ganho de peso mesmo em leitões assintomáticos (MAES et al., 2007).

A infecção por *Cystoisospora* é autolimitante. No interior do organismo do hospedeiro o protozoário se reproduz dando origem a várias gerações, diante do desenvolvimento da imunidade por parte do hospedeiro, essa reprodução diminui consideravelmente, podendo desaparecer completamente (BOWMAN, 2009). A imunidade celular constitui o meio mais importante para o desenvolvimento de resistência à doença, tornando os animais naturalmente resistentes em casos de reinfecções, visto que os anticorpos adquiridos via colostro possuem pouca importância na proteção do leitão contra o desenvolvimento da forma clínica da coccidiose (STUART et al., 1982; KOUDELA E KOUČERVÁ, 2000).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da coccidiose causada por *C. suis* é realizado comumente pela visualização em microscópico óptico de oocistos nas fezes, utilizando métodos de flutuação fecal ou de centrifugo-flutuação. No entanto, a presença de impureza nas fezes, o alto conteúdo de gordura nas fezes de leitões, e o curto período de excreção bem como padrões de excreção de oocistos bastante variáveis acabam dificultando e

limitando o uso da técnica (LINDSAY et al., 1997; MUNDT et al., 2006; KARAMON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008; JOACHIM et al., 2014). Para o diagnóstico da presença de oocistos nas fezes, devem ser amostradas no mínimo cinco leitegadas com idade entre oito e 20 dias, fazendo o *pool* de fezes de cada dois a três leitões. Se a primeira coleta resultar negativa, recomenda-se repeti-la com intervalo de uma semana, pois a chance de detecção aumenta à medida que aumenta a idade dos leitões (MEYER et al., 1999).

Oocistos de *C. suis* são diferenciados dos de *Eimeria* spp. somente após a esporulação destes que ocorre somente no ambiente. Oocistos de *C. suis* possuem estruturas chamadas de *hazy bodies* entre a parede do oocisto e os esporocistos e pelo fato dos oocistos possuírem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, diferentemente dos oocistos de *Eimeria* spp. que possuem quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (LINDSAY et al., 1999).

O diagnóstico pode ser realizado também pela visualização de formas endógenas do protozoário nas células epiteliais do jejuno e íleo, em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (REBOUÇAS et al., 1992).

Lesões macroscópicas são visíveis em casos de infecção severa, onde observa-se membrana fibronecrótica na mucosa do jejuno e íleo. Microscopicamente observa-se uma leve descamação do epitélio intestinal, hiperplasia de criptas, associadas a uma necrose e atrofia focal moderada a leve, das vilosidades, observado principalmente também no jejuno e íleo. No tecido linfóide ocorre hiperplasia, podendo apresentar edema e congestão da lâmina própria com infiltrado inflamatório misto com predomínio de células escamosas (CALDERARO et al., 1997).

A técnica de microscopia de fluorescência, com emissão de luz ultravioleta, constitui uma forma de diagnóstico para detecção de oocistos nas fezes, principalmente em fezes com alto teor de gordura. O uso desta técnica permite aproveitar a autofluorescência dos oocistos, facilitando assim a visualização destes, sendo mais sensível que os métodos tradicionais de flutuação fecal (DAUGSCHIES et al., 2001).

Testes baseados na detecção do ácido nucleico, como reação em cadeia pela polimerase (PCR), são altamente sensíveis (JOACHIM et al., 2004), podendo ser utilizados também como ferramenta de diagnóstico, principalmente em casos onde a obtenção de fezes frescas para visualização de oocistos viáveis esteja comprometida (JOACHIM et al., 2004).

Porém, a extração do material genético a partir das amostras (tecido, fezes), é dispendiosa e exige mão-de-obra treinada podendo ser um fator limitante ao uso da técnica (SHRESTHA et al., 2018).

Poucos são os dados disponíveis no Genbank para espécies de *Cystoisospora* spp., tornando assim o uso rotineiro de primer universal para amplificar o genoma do referido gênero (MATSUBAYASHI et al., 2011). Em suínos, espécies pertencentes aos gêneros *Eimeria* spp. e *Cystoisospora* são relatadas, diante disso o uso de sequenciamento genético permite um diagnóstico mais acurado (MORENO et al., 2007; PENGFEI et al., 2012).

2.7 TRATAMENTO E CONTROLE

O uso profilático de medicamentos com ação anticoccidiana em leitões na primeira semana de vida já é rotina na maioria das granjas de suínos. Dentre os produtos disponíveis para uso nesses animais, a droga de escolha atualmente usada na rotina das granjas é o toltrazuril, aplicado em dose única (20 mg/kg), em leitões com três a cinco dias de vida, via oral, podendo efetivamente reduzir a chance e a quantidade de excreção dos oocistos (WESTPHAL et al., 2007; SKAMPARDONIS et al., 2010; JOACHIM et al., 2011; MENGEL et al., 2012), e promovendo significativos benefícios econômicos, mesmo em casos subclínicos (LEYTON et al., 2011). Quando comparado com outras drogas disponíveis, como o diclazuril e as sulfonamidas, toltrazuril demonstrou efeito superior (MUNDT et al., 2007).

O toltrazuril, é um fármaco com atividade anticoccidiana e antiprotozoária de amplo espectro de ação, podendo ser usado para prevenção da coccidiose neonatal em suínos, mieloencefalite protozoária equina (*Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum*, *Neospora hughesi*) e hepatozoonose canina (*Hepatozoon* spp.) (ADAMS, 2003). Recomenda-se o toltrazuril como medida preventiva para coccidiose suína, e também como terapia para casos com formas clínicas evidentes (MUNDT et al., 2007), atuando nas distintas formas evolutivas do parasita, principalmente nos esquizontes nos macrogametócitos e microgametócitos e alterando a função da cadeia respiratória e as enzimas mitocondriais (SPINOSA et al., 2002). Reduz significativamente a excreção de oocistos e o quadro diarreico em animais infectados (GUALDI et al., 2003; MUNDT et al., 2007). A sua eficácia para o controle e tratamento de coccidiose suína

já foi relatada frequentemente em estudos com leitões infectados experimentalmente (MUNDT et al., 2003; MUNDT et al., 2007).

De acordo com Silva et al. (1998) a utilização somente de medicamentos como medida de controle das diarreias gera resultados irregulares e temporariamente satisfatórios, tornando necessário um estudo sobre as condições de manejo e o ambiente onde os animais se encontram, visando assim reduzir a ocorrência de novos casos e suas possíveis consequências para a produção animal.

A associação do uso de um anticoccidiano com a implantação de um programa de limpeza completa e contínua são fundamentais para um controle efetivo do protozoário (KREINER et al., 2011)

2.8 DISTRUBUIÇÃO

C. suis tem sido relatado em vários países, porém no Brasil poucos são os estudos atuais que aliam a prevalência ou ocorrência de parasitas, em especial o referido protozoário, dada a sua importância de seus impactos na suinocultura brasileira.

Autores como Nish et al. (2000), Lai et al. (2011) e Barbosa et al. (2015) avaliaram a presença de protozoários em suínos, encontrando resultados para coccidios, porém sem a distinção entre os gêneros *Eimeria* sp. e *Cystoisospora* sp. Já Calderaro et al. (2001); D'Alencar et al. (2006); Sator et al. (2007); Leyton et al. (2011); Zhang et al. (2012); Ruiz et al. (2016) e Leon & Borges (2018) avaliaram, especificadamente, a presença de *Cystoisospora suis* em leitões lactentes com média de uma a quatro semanas de idade (TABELA 01).

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE COCCÍDIOS EM SUÍNOS EM DIFERENTES PAÍSES, MÉTODO DIAGNÓSTICO, NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E REFERÊNCIAS.

REFERÊNCIA	ESTADO/PAÍS	MÉTODO DIAGNÓSTICO	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS
León e Borges (2018)	Venezuela	Coproparasitológico (centrifugo-flutuação)	36,7% (210/572)
Leyton et al. (2011)	Canadá	Coproparasitológico (flutuação fecal)	26,4% (187/709)
Lai et al. (2011)	China	Coproparasitológico (flutuação fecal)	22,79% (677/2971)
Zhang et al. (2012)	China	Coproparasitológico (flutuação fecal)	63,9% (83/130)
Ruiz et al. (2016)	São Paulo/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	34,78% (64/184)
Sartor et al. (2007)	Santa Catarina/ Brasil	Coproparasitológico (centrifugo-flutuação)	5% (13/260)
D'Alencar et al. (2006)	Pernambuco/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	0,44% (1/1126)
Calderaro et al. (2001)	São Paulo/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	10,9% (19/174)
Nishi et al. (2000)	Minas Gerais/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	22,8% (26/114)
Nishi et al. (2000)	São Paulo/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	13,7% (58/423)
Barbosa et al. (2015)	Rio De Janeiro/ Brasil	Coproparasitológico (flutuação fecal)	19,2% (135/702)

FONTE: A Autora (2018).

REFERÊNCIAS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Resumo do Setor de Suínos**. Disponível em: <<http://abpa-r.com.br/setores/suinocultura/resumo>> Acesso em: 15 fev. 2019.

ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Medicina Veterinária**. 8ª Edição.

ALMEIDA, F.R.C.L. Dicas sobre o manejo da infertilidade. **Porkworld**, p.56-62, 2003.

BACH, U.; KALTHOFF, V.; MUNDT, H-C.; POPP, A.; RINKE, M.; DAUGSCHIES, A.; LÜTTGE, B. Parasitological and morphological findings in porcine isosporosis after treatment with symmetrical triazintriones. **Parasitology Research**, v.91, p.27–33, 2003.

BARBOSA, A.S.; BASTOS, O.M.P.; DIB, L.V.; DE SIQUEIRA, M.P.; CARDOZO, M.L.; FERREIRA, L.C.; CHAVES, W.T.; FONSECA, A.B.M.; UCHÔA, C.M.A.; AMENDOEIRA, M.R.R. Gastrointestinal parasites of swine raised in different management systems in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.941-946, 2015.

BARTA, J.R.; SCHRENZEL, M.D.; CARRENO, R.; RIDEOUT, B.A. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **Journal of Parasitology**, v.91, n.3, p.726-727, 2005.

BOWMAN, D. **Georgis, Parasitology for Veterinarians**. 9ª Edição. St. Louis Missouri: Saunders, 2009.

BOWMAN, D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2010.

CALDERARO, F.F. Caracterização morfológica das lesões intestinais na coccidiose em leitões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1997, Foz do Iguaçu. **Anais...** Comitê Científico do 8º Congresso da ABRAVES, 1997. p.207.

CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CARRENO, R.A.; SCHNITZLER, B.E.; JEFFRIES, A.C.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M.; BARTA, J.R. Phylogenetic analysis of coccidian based on 18S rDNA sequence

comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p.184-188, 1998.

D'ALENCAR, A.S.; FAUSTINO, M.A.G.; SOUSA, D.P.; de LIMA, M.M; ALVES, L.C. Infecção por helmintos e coccídios em criação de suínos de sistema confinado localizada no município de Camaragibe-PE. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, p.79-86, 2006.

DAUGSCHIES, A.; BIALEK, R.; JOACHIM, A.; MUNDT, H.C.; Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs, and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine faeces. **Parasitology Research**, v.87, p.409-412, 2001.

DUBEY, J.P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi: 1879) in cats and mice. **Journal of Protozoology**, v.26, n.3, p.433-443, 1979.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Extra-intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, n.1, p.89-92, 1972.

ESPÍNDOLA, C. J. Tecnologia e novas relações de trabalho nas agroindústrias de carne do Sul do Brasil. **Scripta Nova: Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales**, v.6, n.119, p.85, 2002.

FRANZEN, C.; MULLER, A.; BIALEK, R.; DIEHL, V.; SALZBERGER, B.; FATKENHEUER, G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. **Parasitology Research**, v.86, n.8, p.669-676, 2000.

FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidian. **Parasitology Research**. v.91, p.384-389, 2003.

FRENKEL, J.K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidian. **Journal of Parasitology**. v.63, p.611-628, 1977.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Rodents as vectors for feline Coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. **Journal of Infectious Diseases**, v.125, n.1, p.69-72, 1972.

GABNER, S.; WORLICZEK, H.L.; WITTER, K.; MEYER, F.R.L.; GERNER, W.; JOACHIM, A. Immune response to *Cystoisospora suis* in piglets. Local and systemic changes in T-cell subsets and selected mRNA transcripts in the small intestine. **Parasite Immunology**, v.36, p.277-291, 2014.

GREGORI, F., BRANDÃO, P.E., ROSALES, C.A.R., CORTEZ, A., HEINEMANN, M.B., RICHTZENHAIN, L.J., JEREZ, J.A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.191-194, 2000.

- GUALDI, V.; VEZZOLI, F.; LUINI, M.; NISOLI, L. Efficacy of Baycox 5% and impact of coccidiosis due to *Isospora suis* on the growth of suckling piglets. In: **Proceedings 18th IPVS Congress**, v.1, p.269, 2003.
- HABERKORN, A.; MUNDT, H.C. Untersuchungem an einem vielseitig einsetzbaren kokzidiosetheraeotikun. **Prakt Tierarzt**, v.4, p.46-51, 1988.
- JESUS, L.P., MÜLLER, G. Helmitos parasitos do estômago de suínos na região de pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.2, p.181-187, 2000.
- JOACHIM A.; MUNDT, H.C. Efficacy of sulfonamides and Baycox® against *Isospora suis* in experimental infections of suckling piglets. **Parasitology Research**, v.109, p.1653–1659, 2011.
- JOACHIM A.; SCHWARZ, L. Coccidia of Swine: Eimeria Species, Cystoisospora (syn. *Isospora*) suis. **H. Mehlhorn (ed.), Encyclopedia of Parasitology**, p. 1-5, 2015.
- JOACHIM, A.; RUTTKOWSKI, B.; ZIMMERMANN, M.; DAUGSCHIES, A.; MUNDT, H.C. Detection of *Isospora suis* in piglet faeces – comparison of microscopy and PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p.140- 142, 2004.
- JOACHIM, A.; SCHWARZ, L.; HINNEY, B.; RUTTKOWSKI, B.; VOGL, C.; MUNDT, H.C. Which factors influence the outcome of experimental infection with *Cystoisospora suis*? **Parasitology Research**, v.113, p.1863-1873, 2014.
- JOHNSON, J.; SAMARASINGHE, B.; BUDDLE, R.; ARMSON, A.; RYAN, U. Molecular identification and prevalence of *Isospora sp.* in pigs in Western Australia using a PCR-RFLP assay. **Experimental Parasitology**, v.120, p.191-193, 2008.
- KARAMON, J.; ZIOMKO, I.; CENCEK, T. Detection of *Isospora suis* coproantigens using indirect sandwich ELISA-a preliminary study. **Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.541, 2007.
- KOUDELA, B.; KOUČEROVÁ, S. Immunity again *Isospora suis* in nursing pigs. **Parasitology Research**, v.86, p.861-863, 2000.
- KREINER, T.; WORLICZEK, H.L.; TICHY, A.; JOACHIM, A. Influence of toltrazuril treatment on parasitological parameters and health performance of piglets in the field – an Austrian experience. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.14–20, 2011.
- LAI, M.; ZHOU, R.Q.; HUANG, H.C.; HU, S.J. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.121-124, 2011.

LEÓN, J.C.P.; BORGES, N.S. Prevalencia de *Cystoisospora suis* en lechones lactantes y cerdas en Venezuela. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.29, p.270-277, 2018.

LEVINE, N.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Vol's I and II. Florida: **CRC press**, 1988.

LEYTON, A.; WEBSTER, E.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; VILAÇA, K.; PEREGRINE, A. An observational study on the prevalence and impact of *Isospora suis* in suckling piglets in southwestern Ontario, and risk factors for shedding oocysts. **Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.184-188, 2011.

LINDSAY et al. Coccidia and other protozoa. **Disease of Swine**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.655-667.

LINDSAY, D.; DUBEY, J. Coccidia and other protozoa. In: Straw BE, *et al* editors. **Diseases of swine**. 9. ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University, 2005. p.861–73.

LINDSAY, D.S.; CURRENTM W.L.; TAYLOR, J.R. Effects of experimentally induced *Isospora suis* infection on morbidity, mortality, and weight gains in nursing pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1511–1512, 1985.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.1, p.19–34, 1997.

LINHARES, G.F.C.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; BARCELLOS, D.; MORENO, A.M.; MATOS, M.P.C. **Doenças dos Suínos**. 2ª Edição. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012.

MAES, D.; VYT, P.; RABAES, P.; GEVAERT, D. Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. **The Veterinary Journal**. v.173, p.197-199, 2007.

MATSUBAYASHI, M., CARRENO, R.A.; TANI, H.; YOSHIUCHI, R.; KANAI, T.; KIMATA, I.; UNI, S.; FURUYA, M.; SASAI, K. Phylogenetic identification of *Cystoisospora* spp. from dogs, cats, and raccoon dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.270–274, 2011.

MENGEL, H.; KRÜGER, M.; KRÜGER, M.U.; WESTPHAL, B.; SWIDSINSKI, A.; SCHWARZ, S.; MUNDT, H.C.; DITTMAR, K.; DAUGSCHIES, A. Necrotic enteritis due to simultaneous infection with *Isospora suis* and clostridia in newborn piglets and its prevention by early treatment with toltrazuril. **Parasitology Research**, v.110, p.1347-1355, 2012.

MEYER, C.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A. Occurrence of *Isospora suis* in larger piglet production 0units and on specialized piglet rearing farms. **Veterinary**

Parasitology, v. 82, p.277–284, 1999.

MORA, L.M.O. Programa de desparasitación em porcino, valoración y eficacia. **Anaporc**, v.201, p.5-20, 2000.

MORENO, A.M.; LINHARES, G.F.C.; SOBESTIANSKY, J. Endoparasitoses. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.373-377.

MOTA, M de A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. V. de. Controle biológico de helmintos de parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MUNDT, H.C.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A.; ZIMMERMANN, M. Population biology studies on *Isospora suis* in piglets. **Parasitology Research**, v.90, p.158–159, 2003.

MUNDT, H.C.; JOACHIM, A.; BECKA, M.; DAUGSCHIES, A. *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. **Parasitology Research**, v.98, p.167-175, 2006.

MUNDT, H.C.; MUNDT-WÜSTENBERG, S.; DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A. Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. **Parasitology Research**, v.100, p.401-411, 2007.

NECHT, D.; POPIOLEK, M.; ZALESNY, G. Does meatness of pig depend on the level of gastro-intestinal parasites infection? **Preventive Veterinary Medicine**, v.99, p.234-239, 2011.

NIESTRATH, M.; TAKLA, M.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A. The role of *Isospora suis* as a pathogen in conventional piglet production in Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.49, p.176-180, 2002.

NISHI, S. M.; GENNARI, S. M.; LISBOA, M. N. T. S.; SILVESTRIM, A.; CAPRONI, L. Jr.; HUMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.67, n.2, p.199-203, 2000.

PENGFEI, H.; JIANHUA, L.; PENGTAO, G.; JINGUI, H.; XICHEN, Z. *Cystoisospora* spp. from dogs in China and phylogenetic analysis of its 18S and ITS1 gene. **Veterinary Parasitology**, v.190, p.254-258, 2012.

PIGI. Parasite Alert. **Pig International**, v.37, n.3, p.25-26, 2007.

PINTO, J.M.S.; COSTA, J.O.; SOUZA, J.C.A. Ocorrência de endoparasitos em suínos criados em Itabuna, Bahia, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.10, p.79-85, 2007.

REBOUÇAS, M.M.; OLIVEIRA, S.; FILHA, E.S.; SANTOS, S.M.; AMARAL, V. *Isospora* suis em suínos no estado de São Paulo – Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, p.137-140, 1992.
Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.

RUIZ, V.L.A.; BERSANO, J.G.; CARVALHO, A.F.; CATROXO, M.H.B.; CHIEBAOD.P.; GREGORI, F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; OGATA, R.A.; SCARCELLI, E.P.; TONIETTI, P.O. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. **BMC Research Notes**, v.9, p.22, 2016.

SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCRRFLP assay. **Experimental Parasitology**. v.118, p.592-595, 2008.

SANTOS, N.M.; LOPES, C.W.G. Morfologia dos oocistos das espécies da família Eimeriidae Minchin, 1903 (Protozoa: Apicomplexa) parasitos de suínos. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**. v.3, n.2, p.41-44, 1988.

SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; DE SOUZA, A.P.; CANTELLI, C.R. Prevalência das espécies de *Eimeria* Schneider, 1875 e *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de suínos do município de Videira, SC, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.6, n.1, p. 38-43, 2007.

SCHNEIDER, A. Sur les psorospermies oviformes ou coccidies. Espèces nouvelles ou peu connues. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, v.9, p. 387-404, 1881.

SHRESTHA, A.; FREUDENSCHUSS, B.; SCHWARZ, L.; JOACHIM, A. Development and application of a recombinant protein-based indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Cystoisospora suis* in swine, **Veterinary Parasitology**, v.258, p.57-63, 2018.

SILVA, C.A., BRITO, B.G., M, N., AMARAL, A.L. Fatores de risco relacionados com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos da região norte do Paraná. **Ciência Rural**, v.28, n.4, 677-681, 1998.

SILVA, R. J. da. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**. 76 p. 2016.

SKAMPARDONIS, V.; SOTIRAKI, S.; KOSTOULASA, P.; LONTIDES, L. Effect of toltrazuril treatment in nursing piglets naturally infected with *Isospora suis*.

Veterinary Parasitology, v.172, p. 46–52, 2010.

SOBESTIANSKY, J., WENTZ, I., SILVEIRA, P.R.S., SESTI, L.A.C. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.388, 1998.

SOTIRAKI, S.; ROEPSTORFF, A.; NIELSEN, J. P.; MADDOX-HYTTEL, C.; ENOE, C.; BOES, J.; MURRELL, K.D.; THAMSBORG, S. M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. **Parasitology**, v.135, p.395–405. 2008.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. Ed. Guanabara-Koogan, p.495-496, 2002.

STUART, B.P.; GOSSER, H.S.; ALLEN, C.B.; BEDELL, D.M. Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isospora suis*. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.46, p.317-320, 1982.

STUART, B.P.; LINDSAY, D.S. Coccidiosis in swine. *Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice**, v.2, p. 455–468, 1986.

STUART, B.P.; LINDSAY, D.S.; ERNST, J.V.; GOSSER, H.S. *Isospora suis* enteritis in piglets. **Veterinary Pathology**, v.17, p.84–93, 1980.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

VÍTOVEC, J.; KOUDELA, B.; KUDWEIS, M.; STĚPÁNEK, J.; SMÍD, B.; DVORÁK, R. Pathogenesis of experimental combined infections with *Isospora suis* and rotavirus in conventional and gnotobiotic piglets, **Zbl. Veterinary Medicine B**, v.38, p.215-226, 1991.

WENYON, C.M. Protozoology. William, **Wood and Company, NewYork**. v.2, p.1396, 1926.

WESTPHAL, B.; BERNEMANN, U.; KATHMANN, L. *Isospora suis* and *Clostridium perfringens* as mixed infection in suckling piglets just after post partum? **Tierärztl Umschau**, v.62, p.682, 2007.

WORLICZEK, H.L.; JOACHIM, A. Neonatal Porcine Coccidiosis Mehlhorn (Ed.), **Progress in Parasitology, Parasitol. Res. Monographs, Springer**, Berlin Heidelberg, v.2, p.79-91, 2011.

WORLICZEK, H.L.; MUNDT, H.C.; RUTTKOWSKI, B.; JOACHIM, A. Age, not infection dose, determines the outcome of *Isospora suis* infections in suckling piglets. **Parasitology Research**, v.105, p.157–162, 2009.

ZHANG, W.J.; XU, L.H.; LIU, Y.Y.; XIONG, B.Q.; ZHANG, Q.L.; LI, F.C.; SONG, Q.Q.; KHAN, M.K.; ZHOU, Y.Q.; HU, M.; ZHAO, J. Prevalence of coccidian infection in suckling piglets in China. **Veterinary Parasitology**. v.190, p.1-2, 2012.

ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W. **Diseases of swine**. 10. New York: Wiley, 2012.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, DESN. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.81–86, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a ocorrência de *Cystoisospora suis* na fase de maternidade, comparando com o uso profilático do toltrazuril em uma granja suinícola do município de Palotina/PR-Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a ocorrência de *C. suis* em leitões e matrizes em uma granja suinícola no município de Palotina-PR com e sem o uso profilático do toltrazuril.
2. Pesquisar as possíveis fontes de infecção do *C. suis* em uma granja suinícola no município de Palotina-PR.
3. Avaliar as vias de transmissão do *C. suis* na fase de maternidade em uma granja suinícola no município de Palotina-PR.
4. Avaliar a interferência da estação do ano na ocorrência de *C. suis* em uma granja suinícola no município de Palotina-PR.

4 **CAPÍTULO 1**

Artigo intitulado: Análise da pressão de infecção do *C. suis* antes e após a suspensão do uso profilático do toltrazuril, em uma granja suinícola em Palotina, PR, BR

Análise da pressão de infecção do *Cystoisospora suis* antes e após a suspensão do uso profilático do toltrazuril, em uma granja suinícola em Palotina, PR, BR

Arielle Aparecida Lara, Ricardo Babinski Bregonde, Ana Paula Molinari Candeias, Vinicius

Dahm, Geraldo Camilo Alberton, Sílvia Cristina Osaki

Acta Tropica 00 (0): 00-00

RESUMO

A coccidiose suína, causada pelo *Cystoisospora suis*, é responsável por perdas produtivas e acomete principalmente animais na fase de lactação que podem se infectar pela ingestão de oocistos remanescentes presentes no ambiente das instalações, ou carregados para dentro das instalações por meio de fômites, vetores ou outros animais. Os sinais clínicos incluem diarreia não hemorrágica com duração aproximada de 10 dias, levando os animais a quadros de desidratação e perda de peso. O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de *Cystoisospora suis* na fase de maternidade, comparando com o uso profilático do toltrazuril em uma granja suinícola localizada no município de Palotina, Estado do Paraná, Brasil, conhecer as possíveis fontes de infecção e vias de eliminação do agente e correlacionar a infecção com a estação do ano. Para isso foram utilizados um grupo controle e um grupo tratado, durante o inverno (junho e julho) e o verão (fevereiro e março), cada grupo foi constituído por nove matrizes alojadas em sala de maternidade com igual estrutura física. As seguintes amostras foram coletadas: fezes das matrizes, água dos bebedouros individuais de cada gaiola, *swabs* retais de cada leitegada, resíduos orgânicos presentes no calçado dos tratadores, *swabs* ambientais pré e pós alojamento, insetos presentes nas salas analisadas e fezes que ficavam acumuladas nos ambientes das gaiolas durante o período de amamentação. As amostras foram submetidas a exames coproparasitológicos e à PCR. A presença de oocistos de *C. suis* nas amostras foi detectada nas seguintes amostras e frequências: fezes de matrizes (2,84%); fezes coletadas no ambiente das gaiolas (20,22%); *swabs* retais dos leitões (9,03%); amostras de água coletadas (7,60%). As demais amostras foram negativas para a presença doo parasita. Não houve correlação entre as vias de transmissão e fonte de infecção estudadas, assim como não houve diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado. Em relação à estação do ano, observou-se maior ocorrência do protozoário durante o inverno. Os resultados demonstram que *C. suis* não está amplamente disseminado no ambiente das maternidades das granjas suinícolas e que o uso profilático do toltrazuril não mostrou ser necessário, podendo assim ser evitado o seu uso indiscriminado, gerando menos custos econômicos e casos de resistência contra essa droga.

Palavras-chave: coccidiose, anticoccidiano, maternidade.

ABSTRACT

Swine coccidiosis is, caused by *Cystoisospora suis*, is responsible for the productive losses and mainly affect animals in the lactation phase and can become infected by ingestion of remaining oocysts present in the environment of the facilities, or carried into the premises by means of fomites, vectors or other animals. Clinical signs include non-hemorrhagic diarrhea that lasts for more than 10 days, leading to dehydration and weight loss. The aim of this study was to determine the occurrence of *Cystoisospora suis* in the maternity phase, comparing with the prophylactic use of toltrazuril in a pig farm in Palotina city, Parana State, Brazil, to know the possible sources of infection and routes of elimination of the agent and to correlate the infection with the season of the year. For this, a control group and a treated group were used during the winter (June and July) and the summer (February and March), each group consisted of nine matrices housed in a maternity ward with the same physical structure. The following samples were collected: feces from the matrices, water from the individual drinking fountains of each cage, rectal swabs from each litter, organic residues present in the trawlers' shoes, environmental swabs pre and post housing, insects present in analyzed rooms and feces accumulated in the environments during the breastfeeding period. Samples were submitted to coproparasitological examination and PCR. The presence of *C. suis* oocysts in the samples and frequencies was: feces of matrices (2.84%); feces collected in the environment of the cages (20.22%); rectal swabs of piglets (9.03%); samples collected (7.60%). The other samples were negative for the presence of the parasite. There was no correlation between the transmission routes and source of infection studied, nor was there a significant difference between the treated and untreated groups. In relation to the season of the year, it was observed a greater occurrence of the protozoan during the winter. The results show that *C. suis* is not widely disseminated in the maternity environment of swine farms and the prophylactic use of toltrazuril has not been shown to be necessary, thus avoiding its indiscriminate use, resulting in less economic costs and cases of resistance against this drug.

Key words: coccidiosis, anticoccidial, maternity.

5.1 Introdução

A coccidiose em leitões é uma doença entérica causada por protozoários da classe Coccidia sendo a espécie *Cystoisospora suis* a principal espécie relacionada às perdas produtivas (MUNDT et al., 2006).

Os leitões podem se infectar ao ingerirem oocistos esporulados presentes no ambiente contaminado por fezes remanescentes de outras leitegadas anteriores, ou serem carregados das outras salas de maternidade por meio de insetos, roedores ou pelos funcionários, ou através da contaminação nos tetos das porcas (LINHARES et al., 2012; LINDSAY et al., 1999). A resistência dos oocistos no ambiente é alta, podendo sobreviver no solo por 15 meses em temperatura de 40 a 45°C, o que poderia justificar a dificuldade no controle e erradicação da coccidiose nas granjas, mesmo após as melhorias realizadas com relação à limpeza e desinfecção na suinocultura atual (LINHARES et al., 2012).

Acreditava-se que as porcas poderiam ser uma fonte de infecção, porém atualmente sabe-se que estes animais raramente excretam oocistos de *C. suis* (LINHARES et al., 2012).

Os sinais clínicos dependem da quantidade de oocistos ingeridos pelo animal, e inclui diarreia de consistência cremosa a pastosa, não hemorrágica (MUNDT et al., 2006), que não responde à antibioticoterapia convencional (SCALA, et al 2009). Devido à diarreia, os leitões desidratam e apresentam redução no ganho de peso e queda no desempenho (SKAMPARDONIS et al., 2010).

O uso profilático de medicamentos com ação anticoccidiana em leitões na primeira semana de vida já é rotina na maioria das granjas de suínos. Dentre os produtos disponíveis para uso nesses animais, o produto mais eficiente é o toltrazuril

que quando comparado com outras drogas disponíveis, como o diclazuril e as sulfonamidas, demonstra efeito superior (MUNDT et al., 2007).

O toltrazuril, é um fármaco com atividade anticoccidiana e antiprotozoária de amplo espectro de ação, podendo ser usado para prevenção da coccidiose neonatal em suínos, mieloencefalite protozoária equina (*Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum*, *Neospora hughesi*) e hepatozoonose canina (*Hepatozoon* spp.) (ADAMS, 2003). O toltrazuril atua nas distintas formas evolutivas do parasita, principalmente nos esquizontes nos macrogametócitos e microgametócitos, alterando a função da cadeia respiratória e as enzimas mitocondriais (SPINOSA et al., 2002).

Poucos têm sido os estudos referentes à infecção por helmintos e coccídios em suínos no Brasil, principalmente os relacionados à frequência e à epidemiologia de parasitas gastrintestinais (d'ALENCAR et al., 2006). Estudos que relatam os efeitos das práticas de manejo, de higiene, do vazão sanitário da sala de maternidade, e a estrutura das instalações da granja no risco de ocorrência e transmissão da doença, também são pouco frequentes (MUNDT et al., 2005; SOTIRAKI et al., 2008). Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi entender a epidemiologia da infecção por *Cystoisospora suis* na fase de maternidade em uma granja suinícola do município de Palotina-PR e avaliar a eficácia do uso profilático do toltrazuril.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Comitê de Ética em Experimentação Animal

Esse estudo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, com protocolo número 25/2017.

5.2.2 Área de Estudo

O experimento foi realizado em uma granja de suínos comercial, no município de Palotina, Paraná, Brasil. A cidade está localizada no oeste paranaense, possuindo clima subtropical úmido, com verões quentes e invernos frios ou amenos, tendo a média anual de temperatura de 20°C. A latitude é de 24° 17' 2" S, longitude de 53° 50' 24" W e altitude de 335 m com precipitação média anual de 1600 a 1800 mm (IAPAR, 2018).

Quatro salas de maternidade foram utilizadas ao total, com nove gaiolas em cada. As matrizes, tanto multíparas como primíparas, permaneciam nestas salas até o desmame dos leitões, que acontecia, em média, aos 21 dias de seu nascimento. Era realizado o sistema de manejo "todos dentro-todos fora", onde após o desmame ocorria a higienização e desinfecção das salas com o uso dos produtos Noval® X Car (concentração 1:40) e o desinfetante Farmasept® Plus associados com jatos de água fria.

O total de matrizes utilizadas para este experimento foi de 36, pertencentes à genética DB e 36 leitegadas com uma média de 11 leitões por leitegada. A granja

possui histórico de diarreia em leitões lactentes e presença de protozoários na fase de maternidade.

Na sala de maternidade os animais ficavam em instalações convencionais de alvenaria, revestidas de cimento com paredes e pisos impermeáveis, sendo que a parte posterior do piso era de ferro galvanizado vazado. As gaiolas eram suspensas do chão com vala para deposição e condução dos dejetos. Cada gaiola possuía um comedouro e bebedouro para as fêmeas, que também eram compartilhados pelos leitões, eventualmente. A climatização do ambiente era feita por meio de ventiladores e o sistema de gotejamento de água por dutos posicionados acima das fêmeas. O teto era forrado com lona plástica e as paredes laterais possuíam cortinas móveis que permitiam uma ventilação natural quando necessário.

Os animais ficavam em regime de confinamento recebendo ração, três vezes ao dia, na forma farelada formulada à base de milho e farelo de soja e suplementadas com minerais e vitaminas para atender às exigências nutricionais dessa fase.

Os escamoteadores eram anexos às gaiolas com paredes e pisos de concreto, possuindo uma abertura lateral e superior de madeira. O aquecimento era feito por meio de energia elétrica, com o uso de lâmpadas halógenas claras.

As fêmeas eram alojadas na maternidade cerca de três a cinco dias precedentes ao parto, o qual era induzido e, em caso de necessidade, era realizado o toque vaginal para auxílio ao nascimento dos leitões. Logo após o nascimento dos leitões realizava-se a amarração do umbigo com barbante umedecido em iodo e no terceiro dia de vida era feito o desgaste dos dentes e aplicação de ferro intramuscular em cada leitão.

5.2.3 Período Experimental

Com o objetivo de compreender o comportamento epidemiológico de *C.suis* no uso profilático e na retirada, intencional, do Toltrazuril o experimento foi realizado utilizando-se grupo experimental, onde houve a administração profilática de toltrazuril e o grupo controle onde os animais não receberam o referido medicamento, o experimento foi feito em duas etapas, sendo uma no inverno e a outra no verão.

O experimento realizado no inverno compreendeu os meses de julho e agosto de 2017, abrangendo assim uma parte do inverno brasileiro, onde foram utilizadas duas salas de maternidade, sendo nove gaiolas em cada uma. O experimento realizado no verão ocorreu durante os meses de fevereiro e março de 2018, abrangendo uma parte do verão brasileiro, sendo utilizada a mesma quantidade de salas de maternidade e gaiolas que se utilizou no inverno. Logo após o experimento do inverno foi solicitada a retirada do Toltrazuril, uma vez que a ocorrência do coccídio foi baixa.

5.2.4 Coleta e Processamento de Amostras

Diferentes amostras biológicas e ambientais foram coletadas com o objetivo de verificar possíveis fontes de infecção, vias de transmissão e vetores responsáveis pela transmissão da isosporose para os leitões. As amostras foram submetidas aos métodos coparassitológicos de Willis-Mollay (1921) modificado e de Sheather (1923) modificado e à reação em cadeia pela polimerase segundo Samarasinghe et al. (2008).

As amostras de fezes submetidas aos exames coproparasitológico foram classificadas, individualmente, quanto à quantidade de oocistos presente, baseando-se em um *score* de acordo com Mengel et al. 2012 (APÊNDICE B).

As amostras que foram submetidas à PCR sofreram extração de DNA utilizando-se o *kit* comercial *DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)* segundo as recomendações do fabricante, com um volume final de 200 µL. Quatro ciclos de congelamento/descongelamento (YANG *et al.*, 2015) foram realizados previamente para garantir a lise eficiente dos possíveis oocistos presentes antes de ser submetido à extração de DNA. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) para visualização.

A tabela 01 resume a coleta e o processamento das amostras realizadas no experimento.

TABELA 1 - COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Amostra	Nº de amostras	Dias das coletas	Exames
Fezes Matrizes	144	-5,0,7,14,21	Willis/Sheather e PCR
Fezes Leitegadas	144	0,7,14,21	PCR
Fezes Gaiola Matrizes	89	0,7,14,21	Willis/Sheather e PCR
Fezes Gaiola Leitegada	94	7,14,21	Willis/Sheather e PCR
Água bebedouro	184	-5,0,7,14,21	PCR
Moscas e baratas	32	0,7,14,21	PCR
Calçados	16	0,7,14,21	Willis/Sheather e PCR
<i>Swab</i> ambiente pré-alojamento	36	-1	PCR
<i>Swab</i> ambiente pós-alojamento	36	22	PCR

FONTE: A Autora (2018).

5.2.4.1 Fezes

Matrizes:

Cento e quarenta e uma amostras de fezes das 36 matrizes alojadas nas salas de maternidade submetidas ao experimento foram coletadas. Essas coletas ocorreram no dia do alojamento destas fêmeas na sala de maternidade, que ocorria em torno de três a cinco dias antes do parto (dia -5), e depois coletadas novamente no dia do nascimento dos leitões (dia 0), repetindo-se a coleta semanalmente (dias 7 e 14) até o desmame (dia 21).

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal armazenadas em recipientes com tampa de rosca, devidamente identificados, e refrigeradas até análise, que ocorria em até sete dias após a coleta. As amostras foram submetidas às técnicas de Willis-Mollay e ao método de Sheather. Amostras positivas foram submetidas à PCR.

Ambiente:

Amostras de fezes que ficavam acumuladas no ambiente das gaiolas foram coletadas sendo 94 fezes de leitões e 89 fezes de matrizes. Durante o período da coleta, algumas gaiolas não tinham nenhuma amostra de fezes ou apenas tinham amostra de fezes de leitão ou somente da porca. As amostras foram coletadas semanalmente, começando a partir do dia do nascimento dos leitões até o término do período de amamentação, de 21 dias. Para as amostras de leitões, foi realizado um *pool* das fezes da leitegada presentes em cada gaiola.

As amostras foram acondicionadas em recipientes com tampa de rosca, devidamente identificados, e refrigeradas até análise, que ocorria em até sete dias

após a coleta. As amostras foram submetidas as técnicas de Willis-Mollay e ao método de Sheather. Amostras positivas foram submetidas à PCR.

Swabs retais (leitões):

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos leitões, com o auxílio de *swabs* estéreis (Absorve®). O *swab* retal para recuperação de fezes foi realizado em cada leitão que constituía a leitegada.

O *swab* de cada leitão foi armazenado, formando o *pool* da leitegada, em tubos cônicos de 50 mL tipo *falcon* com água destilada estéril. No laboratório, cada tubo foi submetido à agitação por aproximadamente um minuto visando o desprendimento da maior quantidade de fezes presentes no material do *swab*, e armazenados a 4°C até o processamento da análise molecular, na qual foi realizada a Reação em Cadeia pela Polimerase. As coletas de fezes realizadas utilizando o *swabs* foram feitas no momento do nascimento do animal, e repetidas semanalmente até o término do período de amamentação, totalizando 144 *pools* de *swabs* retais dos leitões.

5.2.4.2 Água dos bebedouros

Um total de 184 amostras das águas presentes nos bebedouros de cada gaiola foram coletadas no dia do alojamento das fêmeas na sala de maternidade, no dia do nascimento dos leitões e depois a coleta foi repetida semanalmente até o dia do desmame. Amostras de água oriundas da fonte de distribuição para as salas foram coletadas no dia do alojamento e no dia do desmame. Após a coleta, as águas eram

armazenadas em recipientes com tampa de rosca e armazenadas sob temperatura ambiente, até o momento da filtração.

Para a filtração utilizou-se um aparato de filtração da Millipore (Millipore Filter Holder), contendo membrana filtrante de microfibras de vidro, sem resina com 47mm de diâmetro, para a concentração de possíveis oocistos presentes nas amostras. A filtração ocorreu sob pressão negativa e após a membrana foi retirada e colocada em embalagem plástica com PBS *tween*, sendo então friccionada dentro da embalagem e o líquido recuperado após esta fricção foi então centrifugado a 10000rpm por 10 minutos. O sedimento final foi suspenso em 500 µL de tampão de lise (*DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)*), e mantido congelado para posterior extração de DNA.

5.2.4.3 Moscas e baratas

Moscas, baratas e roedores que tivessem tido contato com as salas de maternidade durante o período de amamentação foram coletados. Para tanto, foram colocadas armadilhas no interior de cada sala para capturar estes insetos e roedores. A granja não possui nenhum sistema de controle e prevenção contra esses animais.

As amostras foram acondicionadas em recipientes devidamente fechados e identificados e mantido a 4°C até o momento do processamento molecular.

As moscas e baratas coletadas foram maceradas de forma separada, de acordo com a espécie e a sala a qual foi capturada e em seguida foi realizada a extração de DNA e posterior PCR. Nenhum roedor foi capturado durante a pesquisa.

5.2.4.4 Calçados dos tratadores

Resíduos de matéria orgânica encontrados na sola dos sapatos dos funcionários que tinham contato com as salas de maternidade também foram coletados. Ao entrarem nas respectivas salas, com o auxílio de uma espátula de aço inox, resíduos presentes no solado dos sapatos foram retirados e armazenados em potes de coleta devidamente fechados e identificados. Estes resíduos, que muitas vezes eram constituídos por restos de matéria orgânica, dentre eles fezes, foram submetidos à técnica de Willis-Mollay (1921) modificado. Além da coleta com a espátula, os resíduos foram coletados também utilizando *swabs*, os quais foram armazenados em microtubos de 2 mL contendo água destilada estéril, cada microtubo foi submetido à agitação por aproximadamente um min visando o desprendimento da maior quantidade de material e mantidos a 4°C para posterior análise molecular. Os mesmos materiais coletados foram submetidos a diferentes formas de análise (coproparasitológica e as amostras positivas foram submetidas à PCR).

Ao total foram analisadas 32 amostras oriundas do solado do calçado dos tratadores. Estas amostras foram coletadas semanalmente, iniciando no dia do nascimento dos leitões até o desmame, sendo assim contabilizando duas amostras por semana, em cada uma das quatro salas analisadas durante todo o experimento.

5.2.4.5 *Swabs* pré-alojamento e pós alojamento

No mesmo dia do alojamento das matrizes nas salas de maternidade, antes das fêmeas serem alocadas em suas respectivas gaiolas, foram passados por toda

extensão da gaiola, englobando principalmente fissuras, valetas, buracos existentes no ambiente que favoreciam o acúmulo de fezes, de matéria orgânica.

Ao total foram realizados, 36 *swabs* no pré-alojamento das fêmeas, para cada gaiola foram usados dois *swabs* que foram acondicionados em microtubos de dois mL contendo água destilada estéril, cada microtubo foi submetido à agitação por aproximadamente um minuto visando o desprendimento da maior quantidade de material e mantidos a 4°C para posterior análise molecular. As amostras foram submetidas à PCR.

Amostras superficiais do ambiente (piso e paredes), englobando principalmente fissuras, valetas, buracos existentes no ambiente que favorecessem o acúmulo de fezes, de matéria orgânica, de cada gaiola foram coletados utilizando *swabs*. Essa coleta ocorreu após a limpeza e desinfecção das salas da maternidade.

Ao total foram realizados 36 *swabs* que foram acondicionados em microtubos de 2 mL contendo água destilada estéril, cada microtubo foi submetido à agitação por aproximadamente um minuto visando o desprendimento da maior quantidade de material e mantidos a 4°C para posterior análise molecular.

5.2.4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o procedimento FREQ e CORR do programa SAS 9.1.3.

5.3 Resultados e discussão

5.3.2 Swabs retais (leitões)

Das 144 amostras de *pool* de swabs retais coletadas de cada leitegada, nas duas estações do ano avaliadas, 13 (9,03%) foram positivas para *C.suis* na técnica da PCR, correspondendo a nove das 36 (25%) leitegadas analisadas, compreendendo leitões com idade entre sete e 21 dias. Todas as amostras positivas foram obtidas durante o período do inverno, não sendo observada positividade nas amostras coletadas durante o verão (Tabela 02). Esta baixa ocorrência se assemelha ao observado Cruz Junior et al. (2013) que encontraram *C. suis* em apenas 3,3% das amostras de fezes de 60 leitões lactentes na primeira semana de vida, os autores relacionaram seus baixos resultados com a idade dos animais analisados, sugerindo que a coccidiose é rara em leitões entre um e sete dias de idade, no qual de acordo com Martineau & Castillo (2000). A infecção por *C.suis* é mais frequente durante a segunda e terceira semana de vida dos leitões.

TABELA 2 - RESULTADOS DA PCR DE FEZES DE LEITÕES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE *C. suis* EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.

Amostra/Dia/ N°. positivos	0	7	14	21
Leitões grupo controle/inverno	0	0	3	0
Leitões grupo tratado/inverno	0	3	4	3
Leitões grupo controle/verão	0	0	0	0
Leitões grupo tratado/verão	0	0	0	0

FONTE: A autora (2019)

Sartor et al. (2007) ao analisarem fezes de leitões lactentes no estado de Santa Catarina encontraram apenas 5% das amostras contaminadas com *C. suis*, correlacionando o baixo resultado com as boas condições de manejo realizada nas

instalações analisadas e o uso de produto de forma preventiva para *C. suis*. Pettersson et al. (2019) ao analisarem fezes de 791 leitegadas oriundas de 81 granjas, encontraram uma prevalência de $11,9 \pm 15,1\%$ em leitões com duas semanas de idade, e $10,7 \pm 16,7\%$ em leitões com quatro semanas, os autores consideraram sua porcentagem baixa comparada aos dos demais pesquisadores por eles citados, justificando que em seu experimento o manejo utilizado passou a ser o sistema “todos-dentro-todos-fora”.

O percentual de amostras positivas para *C. suis* nos leitões, observado neste trabalho, pode estar relacionado com as condições de manejo realizadas no ambiente que era utilizada o sistema “todos-dentro-todos-fora” e podemos considerar também que a limpeza e desinfecção realizadas eram eficazes visto que não foram encontrados oocistos residuais presentes após estes procedimentos, assim não favorecendo a contaminação dos animais por *C. suis*. Sotikari et al. (2007) demonstraram que a limpeza das instalações da maternidade pode ser um método eficaz para evitar a disseminação do protozoário entre as leitegadas.

Das amostras positivas, três foram coletadas na segunda semana de vida (D7) dos leitões, sete na terceira semana (D14) e três na quarta semana de vida (D21). Ambas as salas analisadas apresentaram leitegadas com resultados positivos, sendo que em uma delas houve apenas três amostras positivas. Apenas uma leitegada foi positiva durante a segunda, terceira e quarta semanas de vida.

Nos animais positivos houve diferença entre o grupo controle e o tratado na segunda e na quarta semana de vida dos leitões, todos os animais positivos pertenciam ao grupo tratado. Já na terceira semana não houve diferença significativa, tendo a presença do protozoário tanto no grupo tratado como no controle.

León et al. (2018) também encontraram uma maior quantidade de animais parasitados com *C.suis* durante as duas primeiras semanas de vida. A ausência de um programa adequado de profilaxia e controle da granja pode aumentar a pressão de infecção nessa faixa de idade (LEÓN et al. 2018). Já Niestrath et al. (2002) encontraram animais parasitados com três a quatro semanas de vida, coincidindo com os resultados também encontrados no presente estudo, pois animais nessa idade também foram positivos, porém em menor quantidade quando comparada às demais idades.

Algumas leitegadas que apresentaram positividade nas fezes do ambiente, também foram positivas na PCR dos *swabs* retais, sugerindo que os animais infectados eram os leitões e não as matrizes.

Ao analisar os resultados obtidos no experimento do inverno, onde foi observada diferença significativa encontrando maior positividade no grupo tratado, foi sugerido ao proprietário a suspensão do toltrazuril profilático para evitar a pressão de seleção de parasitas resistentes e por questões econômicas.

Dessa forma durante todo o período que compreendeu o final do experimento de inverno (julho) até o início do experimento de verão (janeiro) os animais do rebanho não receberam mais o tratamento profilático utilizando o toltrazuril.

E mesmo com essa suspensão, ao iniciar o experimento de verão, em fevereiro, em nenhum leitão foram encontrados oocistos de *C. suis*, tanto no grupo tratado, quanto no grupo controle.

5.3.1 Matrizes

Das 141 amostras de fezes analisadas, nas duas estações do ano avaliadas, apenas quatro (2,84%) apresentaram oocistos de coccídios, sendo estas oriundas de três das 36 matrizes analisadas.

Durante o inverno duas fêmeas, do grupo controle, eliminaram oocistos, sendo que a presença destes foi considerada rara pois foi observado somente um oocisto, em cada amostra, durante o exame coproparasitológico. Uma mesma fêmea eliminou oocisto na primeira semana pós nascimento dos leitões, e na última (quarta) semana (Tabela 03). A segunda fêmea positiva eliminou oocisto somente na última semana. No grupo tratado nenhuma matriz eliminou oocistos durante o inverno.

Durante todo o experimento do verão apenas uma fêmea, também do grupo controle, foi positiva, na terceira semana pós nascimento dos leitões, sendo observados apenas três oocistos no coproparasitológico (Tabela 03).

TABELA 3 - RESULTADOS DOS EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E MOLECULAR DE FEZES DE MATRIZES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE COCCÍDIOS EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.

EXAME	W	S	P	W	S	P	W	S	P	W	S	P	W	S	P
Amostra/Dia/Nº.	-5			0			7			14			21		
positivos															
Matrizes GC/inverno	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
Matrizes GT/inverno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matrizes GC/verão	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Matrizes GT/verão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FONTE: A Autora (2019).

GC: Grupo controle; GT: Grupo tratado; W: Willis; S: Sheather; P: PCR

Os resultados demonstram que as matrizes excretam raramente ou não excretam oocistos de *C. suis*, como afirmam Linhares et. al. (2012). Neste trabalho foi observado que nas duas estações avaliadas houve positividade, porém com uma ocorrência muito baixa.

Porém, mesmo em baixa quantidade, os oocistos podem tornar-se infectantes e contaminar todo o ambiente, especialmente quando há problemas higiênicos-sanitários e de manejo (LEÓN, 2009), e conseqüentemente a leitegada.

SOTIRAKI et al. (2008) afirmam que as matrizes não desempenham um papel importante na transmissão de *C. suis* para a leitegada, como observamos em nosso trabalho, onde apenas uma leitegada, de três matrizes positivas, foi contaminada.

5.3.3 Ambiente

Das 183 amostras de fezes coletadas no ambiente das gaiolas, em 37 foram encontrados oocistos de coccídios, sendo que 31 eram fezes de leitões e seis eram das matrizes (TABELA 04)

TABELA 4 - RESULTADOS DOS EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E MOLECULAR DE FEZES DE GAIOLAS DE MATRIZES E DE LEITÕES DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE COCCÍDIOS EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.

EXAME Amostra/Dia/Nº. positivos	W			S			P			W			S			P		
	0	7	14	21	0	7	14	21	0	7	14	21	0	7	14	21		
Gaiola Matrizes grupo controle/inverno	0	0	-	0	0	0	2	2	0	1	1	0						
Gaiola Matrizes grupo tratado/inverno	0	0	-	0	0	-	0	0	0	3	3	0						
Gaiola Matrizes grupo controle/verão	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-						
Gaiola Matrizes grupo tratado/verão	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-						
Gaiola Leitões grupo controle/inverno	0	0	0	2	2	2	5	5	5	4	4	4						
Gaiola Leitões grupo tratado/inverno	0	0	-	0	0	-	1	1	1	6	6	6						
Gaiola Leitões grupo controle/verão	0	0	0	0	0	0	3	3	3	4	4	4						
Gaiola Leitões grupo tratado/verão	0	0	0	2	2	2	0	0	0	3	3	3						

FONTE: A autora (2019).

W: Willis; S: Sheather; P: PCR; -: amostra não coletada

Analisando-se o grupo controle e tratado e a estação do ano para cada período, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$). Tratar ou não tratar os animais não interferiu na ocorrência do protozoário, bem como a estação do ano.

Kreiner et al. (2011) ao analisarem a eficácia do toltrazuril em leitões observaram que o grupo tratado foi significativamente mais saudável e apresentou

diminuição da diarreia, bem como a porcentagem de leitões desmamados foi mais elevado neste grupo. Porém os animais que recebiam o toltrazuril permaneciam em situações higiênicas-sanitárias precárias e tiveram maior risco de desenvolver doenças e diarreia. O tratamento com toltrazuril é recomendado em granjas onde a coccidiose clínica é observada, associado a condições de higiene adequadas controlam efetivamente a diarreia neonatal.

Diversos autores relatam que o uso do toltrazuril produz resultados significativos, permitindo assim um melhor ganho de peso nos animais e melhor desempenho corporal (Mundt et al., 2007; Skampardonis et al., 2010; Rypula et al., 2012).

Em nosso estudo não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os animais tratados e os não tratados, assim como para Mundt et al. (2005) e Lippke et al. (2011) que não observaram diferença significativa entre o tratamento com toltrazuril e a ocorrência de oocistos de *C. suis*. Deve-se levar em conta que na granja estudada, casos de coccidiose clínica não eram tão comuns e os animais não estavam excessivamente parasitados. Para Maes et al. (2007), é recomendável fazer o exame coproparasitológico antes do início do tratamento de rotina, pois em granjas que não apresentam sintomatologia clínica da coccidiose, sem prévia avaliação da presença de *C. suis* não resulta em resposta efetiva nos custos.

As amostras positivas foram submetidas à PCR para a detecção de *C. suis*, onde 11 (31,43%) amostras foram positivas nesta técnica. Em duas amostras não foi possível realizar a PCR pois não havia material fecal suficiente.

A maioria das amostras apresentaram quantidades insignificantes de oocistos. Os resultados obtidos demonstram que *C. suis* não está amplamente

difundido entre os ambientes das gaiolas, e quando presente apresenta-se em baixa quantidade.

Das amostras de fezes das matrizes coletadas no ambiente das gaiolas, apenas duas amostras já haviam sido positivas quando coletadas diretamente da ampola retal da fêmea. Possivelmente as demais amostras de fezes ambientais, das matrizes, que foram positivas ocorreu contaminação ambiental, visto que fezes de matrizes e leitões ficam todas acumuladas em um mesmo local, podendo ocorrer facilmente contaminação cruzada.

A consistência fecal de todas as amostras foi avaliada imediatamente após a coleta e registrada em duas categorias distintas. Das 37 amostras positivas, apenas cinco apresentaram consistência pastosa a líquida, não havendo correlação entre a presença do protozoário e a consistência pastosa a líquida (de acordo com a tabela de valores críticos do coeficiente de correlação a 5%).

5.3.4 Água dos Bebedouros

Das 184 amostras de água dos bebedouros individuais de cada gaiola coletadas, apenas 7,60% (14/184) foram positivas para *C. suis*, analisadas utilizando a PCR (TABELA 05).

TABELA 5 - RESULTADOS DA PCR DE ÁGUA DOS BEBEDOUROS INDIVIDUAIS DAS GAIOLAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL PARA A DETECÇÃO DE *C. suis* EM GRANJA SUINÍCOLA DE PALOTINA - PARANÁ.

Amostra/Dia/ N°. positivos	-5	0	7	14	21
Grupo controle/inverno	0	0	0	0	0
Grupo tratado/inverno	1	0	1	0	1
Grupo controle/verão	3	4	1	1	1
Grupo tratado/verão	2	0	0	0	0

FONTE: A Autora (2019).

Os resultados demonstram que *C. suis* está presente na água dos bebedouros dos animais, podendo esta, constituir uma via de transmissão do protozoário, que ao

ser ingerido juntamente com a água irá se estabelecer no intestino, penetrando as células epiteliais e assim dar origem a um novo parasitismo (VASCONCELOS et al., 2008).

O bebedouro utilizado nas instalações permitia o acúmulo de água em um recipiente, criando assim um meio ainda mais propício para o desenvolvimento do parasita e facilitando a transmissão, pois essa água não era renovada constantemente, somente quando o animal a ingeria. Ao correlacionar a água com as leitegadas observou-se um valor de 0,118 que apesar de ser considerado baixo, indica que a água poderia constituir um meio de transmissão.

Ao analisarmos, de acordo com o período do desmame que ocorreu a coleta e a estação do ano, as águas de bebedouros coletadas no alojamento (D-5), no dia do nascimento dos leitões (D0) e na terceira semana de vida (D14), tiveram diferença significativa, onde nestas datas houve ocorrências, apenas durante o verão. Já na segunda semana de vida (D7) e na quarta semana (D21) não houve diferença, pois, ocorreu uma amostra positiva em cada estação, nesse caso tanto o verão como o inverno tiveram ocorrências.

Ao analisar o coeficiente de correlação para cada estação do ano, observa-se que no verão a correlação entre a ocorrência de *C. suis* na água com a presença nas leitegadas foi nula (zero), uma vez que nenhuma leitegada apresentou o protozoário durante esta estação. Nesse caso a água não atuaria como veículo transmissor. No inverno, esta correlação foi de 36%, considerada uma baixa associação, nesse caso não necessariamente a presença do protozoário na água significou que os animais foram contaminados.

5.3.5 Moscas e baratas

Não houve positividade nas amostras de moscas e baratas coletadas durante o verão, em nenhum dos dois testes empregados. Todas as amostras coletadas foram negativas, nesse caso as moscas e baratas não atuaram como vetores. Porém, considerando o fato que o número de insetos coletados foi pouco significativo, talvez este resultado tenha ficado subestimado.

5.3.6 Calçado dos Tratadores

As amostras de resíduos de fezes, matéria orgânica, coletadas no solado do calçado dos tratadores, apresentaram-se todas negativas. Os resultados demonstram que os calçados dos tratadores não constituíram fômite para transmissão de *C. suis*.

5.3.7 Swabs pré alojamento e pós limpeza e desinfecção

Todas as amostras coletadas em cada gaiola, no pré alojamento e após limpeza e desinfecção, para detecção de possíveis oocistos residuais nas instalações apresentaram resultados negativos, portanto o ambiente das gaiolas não constituiu uma via de transmissão para os animais.

Leon (2009) observou influência do material do piso utilizado nas instalações das salas de maternidade em relação a permanência de oocistos nas instalações. Em pisos sólidos e mistos (plástico e sólido) observou-se maior ocorrência de *C. suis*, pois nestes tipos de pisos seria difícil executar uma boa limpeza e desinfecção, favorecendo a permanência dos oocistos dentro dos alojamentos. Já os pisos de

plástico permitem uma melhor limpeza e desinfecção reduzindo a chance de sobrevivência de eventuais oocistos residuais de leitegadas anteriores. Skampardonis et al. (2012) verificaram que leitegadas alojadas em piso de plástico vazado tinham 2,81 vezes menos chances de serem positivos para *C. suis* quando comparado a animais alojados em pisos de outro material, como o de metal.

No presente estudo apesar do material das instalações das gaiolas ser piso sólido (cimento), todas as amostras coletadas em cada gaiola foram negativas. Este resultado pode estar relacionado ao fato que antes do alojamento e após o término deste período e posterior limpeza e desinfecção, os resíduos de fezes e matéria orgânica que restavam eram praticamente imperceptíveis, as gaiolas ficavam, aparentemente, sem nenhum tipo de resíduo, e com isso a quantidade de material que era recuperado com o *swab* tornava-se escassa. Mundt et al. (2005) ao analisar diferentes tipos de pisos usados nas instalações, como pisos parcialmente ripados, totalmente ripados, pisos inteiramente sólido sem ripa, e pisos com maravalha, observaram que o tipo de piso usado e a desinfecção realizada não afetaram a ocorrência de oocistos de *C. suis*.

No presente trabalho, foi observada a ocorrência de *C. suis* somente no período do inverno, sendo que no verão não se observou, em nenhuma amostra coletada diretamente da ampola retal dos leitões, positividade para o referido protozoário. Meyer et al (1999) realizaram um estudo na Alemanha e observaram maior excreção no verão com 66,3% das leitegadas positivas quando comparada as outras estações, principalmente ao inverno. Nessa estação, apesar das temperaturas externas às instalações serem mais baixas, no interior das maternidades, principalmente nos escamoteadores, devido a presença das lâmpadas aquecedoras

as temperaturas tendem a ficar mais elevadas (32 a 35°C) favorecendo a esporulação mais rápida dos oocistos e a continuidade do ciclo do protozoário (DE PAIVA, 1996).

Durante a coleta realizada no inverno, a Umidade Relativa do Ar (UR) variou de 53% a 89%, com média de 70%, já as temperaturas ficaram em uma faixa 34,9°C a 1,4°C com média de 27,4°C, e a precipitação se manteve em 0 mm durante praticamente todo o experimento ocorrendo apenas picos esporádicos que variaram de 9 mm a 25 mm. Na coleta ocorrida no verão, a UR variou de 61% a 92%, com média de 75%, as temperaturas ficaram em uma faixa de 34,8°C a 15,1°C com média de 31,5°C e a precipitação se manteve em 0 mm na maior parte do experimento, ocorrendo picos esporádicos com 35, 40 e 45 mm (SIMEPAR, 2019). A coccidiose suína pode ocorrer em qualquer época do ano, sendo que os surtos tendem a ocorrer no verão e o outono, onde as temperaturas mais elevadas e a umidade favorecem a esporulação dos oocistos (ROSTAGNO et al., 1999).

Por não haver uma presença tão evidente e clínica de parasitoses, durante o inverno, pode ocorrer uma menor atenção por parte dos tratadores e produtores, em relação ao manejo, visto que é uma época onde teoricamente, não se observa a presença evidente de parasitas e seus efeitos nos animais. Desse modo, as lâmpadas permanecendo ligadas a maior parte do tempo, os animais mais aglomerados, favorecendo assim o contato entre eles e a retenção do calor dentro do escamoteador, cria um ambiente mais quente e mais propício a esporulação dos oocistos, quando comparado ao verão, que apesar de ocorrer temperaturas mais elevadas externamente, no interior das instalações os animais não se aglomeram tanto e as lâmpadas ficam ligadas um menor período de tempo, não gerando um calor interno tão propício ao protozoário.

Durante o desenvolvimento do projeto, as condições climáticas predominantes observadas se mantiveram relativamente quentes. De acordo com Langkjær e Roepstorff (2008) oocistos de *C. suis* podem ter uma resistência ambiental muito menor do que se presume. Oocistos eliminados dias antes da desmama passam pelos procedimentos de limpeza e desinfecção e vazios sanitários até o alojamento e nascimento da próxima ninhada, o período em que ocorrem todos estes procedimentos pode ser impactante para a sobrevivência dos oocistos em condições de microclima onde predominam-se temperaturas quentes e secas, facilitando a quebra do ciclo de transmissão do protozoário. O aumento na dessecação dos ambientes em que os animais ficam alojados reduzem o número de oocistos infectantes que permaneceram no ambiente mesmo após a limpeza e desinfecção. Para esses autores, mesmo em condições climáticas com umidade elevada (75%) e temperatura de 20 a 30°C, os oocistos morrem em um prazo de 24 a 60 horas. No presente estudo, o referido protozoário foi submetido a condições climáticas onde as temperaturas e a UR se mantiveram relativamente altas, mesmo durante o inverno, o que pode ter favorecido assim a interrupção do ciclo de vida de *C. suis* no ambiente analisado.

O fato da matriz ser primípara ou múltipara influencia na resistência dos leitões perante *C. suis*. Leitões nascidos de fêmeas múltiparas recebem em maior quantidade e qualidade anticorpos colostrais quando comparado a leitões de fêmeas primíparas, gerando assim leitões com melhor capacidade imunológica, desenvolvendo um sistema imunológico capaz de combater infecção por *C. suis* (LEÓN, 2009). No presente estudo, as fêmeas alojadas durante o inverno eram primíparas, observando-se leitões menos resistentes a infecção por coccídios, onde seis das nove leitegadas geradas foram positivas para *C. suis* durante as semanas subsequentes da

maternidade. Já as matrizes analisadas no verão, onde todas eram multíparas nenhuma leitegada foi positiva para *C.suis*, bem como na sala dois do inverno, onde apenas três leitegadas foram positivas e somente durante a terceira semana de vida.

Ao correlacionar o conjunto de resultados obtidos em cada categoria avaliada, observou-se que a correlação entre matrizes e leitegadas possuiu valor de -0,017, valor este considerado como nulo, portanto as matrizes não constituíram uma fonte de infecção para os leitões. A correlação entre fezes acumuladas no ambiente e leitegada apresentou valor de -0,029 considerado nulo também, desse modo as fezes do ambiente também não constituíram uma via de transmissão. A correlação entre a água dos bebedouros e a leitegada apresentou valor de 0,118 valor este considerado muito baixo, sendo assim pouco sugestivo que a água dos bebedouros possa ser uma via de transmissão para os filhotes.

5.4 Conclusão

C. suis não está amplamente disseminado dentro do ambiente das maternidades estudadas, sendo observado com maior ocorrência durante o inverno.

As fêmeas matrizes, o ambiente das gaiolas no pré e pós alojamento bem como durante o alojamento, moscas e baratas e material contido no calçado dos tratadores não foram os disseminadores de *C.suis* para a leitegada. Sugere-se que a água presente nos bebedouros de cada gaiola poderia ser a mais provável via de transmissão, porém com um valor de correlação considerado baixo, não seria esta a principal via.

O tratamento à base de toltrazuril não interferiu na ocorrência do protozoário nos animais. Neste caso, tratar ou não os animais, não determinou a ocorrência ou ausência do referido protozoário.

REFERÊNCIAS – CAPÍTULO 1

- ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Medicina Veterinária**. Oitava Edição. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
- D' ALENCAR, A.S., FAUSTINA, M.A.G., SOUSA, D.P., DE LIMA, M.M., ALVES, L.C. Infecção por helmintos e coccídios em criação de suínos de sistema confinado localizado no município de Camaragibe-PE. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. 9, 79-86, 2006.
- DE PAIVA, D.P. Suinocultura dinâmica – Isosporose suína. **Periódico técnico-informativo** elaborado pela EMBRAPA–CNPQA, 1996.
- KREINER, T., WORLICZEK, H.L., TICHY, A., JOACHIM, A. Influence of toltrazuril treatment on parasitological parameters and health performance of piglets in the field – an Austrian experience. **Vet. Parasitol.** 183, 14–20, 2011.
- LANGKJÆR, M., ROEPSTORFF, A. Survival of *Isospora suis* oocysts under controlled environmental conditions. **Vet. Parasitol.** 152, 186–193, 2008.
- LEÓN, J.C.P. Prevalencia de *Isospora suis* en granjas porcinas intensivas ubicadas en el estado Aragua, Venezuela. **Zootecnia Trop.** 27, 205-213, 2009.
- LEÓN, J.C.P., BORGES, N.S. Aspectos de la dinámica de infección de *Cystoisospora suis* en lechones lactantes de una granja piloto del estado Carabobo, Venezuela. **Rev. Cient.** 28, 42-51, 2018.
- LINDSAY et al. Coccidia and other protozoa. In: **Disease of Swine**. Oitava edição. Ames: Iowa State University Press, 655-667, 1999.
- LINHARES, G.F.C., SOBESTIANSKY, J., LINHARES, D., BARCELLOS, D., MORENO, A. M., MATOS, M.P.C. **Doenças dos Suínos**. Segunda edição. Cânone Editorial, Goiânia, 2012.
- LIPPKE, R.T., BOROWSKI, S.M., MARQUES, S.M.T., PAESI, S.O., ALMEIDA, L.L., MORENO, A.M., CORBELLINI, L.G., BARCELLOS, D.E.S.N. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesqui. Vet. Bras.** 31, 505–10, 2011.
- MAES, D., VYT, P., RABAES, P., GEVAERT, D. Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. **Vet. J.** 173, 197-199, 2007.
- MARTINEAU, G.P., CASTILLO, J. Epidemiological, clinical and control investigations on field porcine coccidiosis: clinical, epidemiological and parasitological paradigms? **Parasitol. Res.** 86, 834-837, 2000.
- MENGEL, H., KRUGER, M., KRUGER, M.U., BERNHARD, W., SWIDSINSKI, A., SCHWARZ, S., MUNDT, H-C., DITTMAR, K., DAUGSCHIES, A. Necrotic enteritis due to simultaneous infection with *Isospora suis* and clostridia in newborn piglets and

its prevention by early treatment with toltrazuril. **Parasitol. Res.** 110, 1347–1355, 2012.

MEYER, C., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A. Occurrence of *Isospora suis* in larger piglet production units and on specialized piglet rearing farms. **Vet. Parasitol.** 82, 277-284, 1999.

MUNDT, H.C., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A.; ZIMERMANN, M. Population biology studies on *Isospora suis* in piglets. **Parasitol. Res.** 90, 158-159, 2003.

MUNDT, H.C., COHNEN, A., DAUGSCHIES, A., JOACHIM, A., PROSL, H., SCHMÄSCHKE, R., WESTPHAL, B. Occurrence of *Isospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. **J. Vet. Med.** 52, 93-97, 2005.

MUNDT, H.C., JOAQUIM, A., BECKA, M. & DAUGSCHIES A. *Isospora suis*: na experimental modelo for mammalian intestinal coccidiosis. **Parasitol. Res.** 98, 167-175, 2006.

MUNDT, H.C., MUNDT-WÜSTENBERG, S., DAUGSCHIES, A., JOACHIM, A. Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. **Parasitol. Res.** 100, 401-411, 2007.

NIESTRATH, M., TAKLA, M., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A. The role of *Isospora suis* as a pathogen in conventional piglet production in Germany. **J. Vet. Med.** 49, 76-180, 2002.

PETTERSSON, E., HESTAD, S., MÖTTUS, I., SKIÖLDEBRAND, E., WALLGREN, P. Rotavirus and *Cystoisospora suis* in piglets during the suckling and early post weaning period, in systems with solid floors and age segregated rearing. **Porcine Health Manag.** v. 7, p. 1-10, 2019.

ROSTAGNO, M.H., BICALHO, K.A., LAGE, A.P. Prevalência de *Isospora suis* em leitões de granjas comerciais de ciclo completo. In: **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**. Belo Horizonte. p. 195-196, 1999.

RYPULA, K., POROWSKI, M., KABA, J., GORCZYKOWSKI, M., DENIZ, A. Effect of Isosporiasis Prevention with Toltrazuril on Long-Term Pig Performance. **Scientific World Journal.** 1-4, 2012.

SAMARASINGHE, B., JOHNSON, J., RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. **Exp. Parasitol.** 118, 592–595, 2008.

SARTOR, A.A., BELLATO, V., SOUZA, A.P., CANTELLI, C.R. Prevalência das espécies de *Eimeria* Schneider, 1875 e *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de suínos do município de Videira, SC, Brasil. **Rev. Ciên. Agro.** 6, 38-43, 2007.

SCALA, A., DEMONTIS, F., VARCASIA, A., PIPIA, A.P., POGLAYEN, G., FERRARI, N., GENCHI, M. Toltrazuril and sulphonomide treatmente against naturally *Isospora suis* infected suckling piglets: Is there na actual profit? **Veterinary Parasitology**. 163, 362-365, 2009.

SOTIRAKI, S., ROEPSTORFF, A., NIELSEN, J.P., MADDOX-HYTTEL, C., ENØE, C., BOES, J., MURRELL, K.D., THAMSBORG, S.M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling under on-farm conditions. **Parasitology**. 135, 395-405, 2008.

SOTIRAKI, S., ROEPSTORFF, A., NIELSEN, J.P., MADDOX-HYTTEL, C., ENØE, C., BOES, J., MURRELL, K.D., THAMSBORG, S.M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. **Parasitology**. 135, 395 – 405, 2018.

SKAMPARDONIS, V., SOTIRAKI, S., KOSTOULAS, P., LEONTIDES, L. Effect of toltrazuril treatment in nursing piglets naturally infected with *Isospora suis*. **Vet. Parasitol**. 172, 46-52, 2010.

SPINOSA, H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, Terceira Edição. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

SKAMPARDONIS, V., SOTIRAKI, S., KOSTOULAS, P., LEONTIDES, L. Factors associated with the occurence and level of *Isospora suis* oocyst excretion in nursing piglets of Greek farrow-to-finish herds. **J. Vet. Res**. v. 8, p. 9, 2012.

SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **J. Comp. Pathol. Ther**. 36, 266-275, 1923.

SIMEPAR – **Sistema Meteorológico do Paraná**. Dados meteorológicos de Palotina –PR. Acesso em: 15 fev. 2019.

VASCONCELO, M.G.C., TALON, D.D.B., SILVA JR, C.A.D., NEVES, M.F., SACCO, S.R. Isosporose nos animais domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 10, 2008.

WILLIS, I.I. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Aust**. 8, 375-376, 1921.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo e possui uma capacidade muito grande de subir esse ranking, por ser um país continental, com grande capacidade de produção animal e agrícola.

Apesar dos grandes avanços nas tecnologias e melhorias nas condições de manejo, os parasitas ainda constituem um problema importante na produção de suínos.

O *C. suis* é o mais importante coccídio dos suínos e ainda assim, muitas lacunas acerca da sua epidemiologia ainda existem, porém o uso profilático de medicamentos como o toltrazuril é rotina na maioria das granjas de suínos.

Essa utilização é feita sem nenhum critério técnico e atualmente com o conceito de Saúde Única, muito se discute sobre a utilização de antimicrobianos na Saúde Animal e seu impacto na Saúde Pública, especialmente em relação aos antibióticos.

Apesar de não ser utilizado ainda na medicina humana, o toltrazuril já vem sendo estudado como uma alternativa para o tratamento de doenças de seres humanos (SILVA, 2016) e dessa forma, os cuidados com a sua utilização indevida na medicina veterinária já devem ser tomados para evitar a pressão de seleção de parasitas resistentes.

O presente estudo demonstrou que na granja estudada não há a necessidade da utilização do toltrazuril de forma preventiva e que o ideal é que exames coproparasitológicos sejam realizados para verificar a presença do parasita para então realizar o tratamento adequado.

Contudo, o desenvolvimento de mais pesquisas envolvendo ambientes diferentes do avaliado nesta pesquisa ainda são necessários, abrangendo um maior

período de experimento, bem como a investigação de outras possíveis fontes de infecção e vias de transmissão do referido protozoário, principalmente ao se considerar que estudos com esse enfoque são raros e que a epidemiologia de *C. suis* ainda não está bem estabelecida.

REFERÊNCIAS

- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Resumo do Setor de Suínos**. Disponível em: <<http://abpa-r.com.br/setores/suinocultura/resumo>> Acesso em: 15 fev. 2019.
- ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Medicina Veterinária**. 8ª Edição.
- ALMEIDA, F.R.C.L. Dicas sobre o manejo da infertilidade. **Porkworld**, p.56-62, 2003.
- BACH, U.; KALTHOFF, V.; MUNDT, H.-C.; POPP, A.; RINKE, M.; DAUGSCHIES, A.; LÜTTGE, B. Parasitological and morphological findings in porcine isosporosis after treatment with symmetrical triazintriones. **Parasitology Research**, v.91, p.27–33, 2003.
- BARBOSA, A.S.; BASTOS, O.M.P.; DIB, L.V.; DE SIQUEIRA, M.P.; CARDOZO, M.L.; FERREIRA, L.C.; CHAVES, W.T.; FONSECA, A.B.M.; UCHÔA, C.M.A.; AMENDOEIRA, M.R.R. Gastrointestinal parasites of swine raised in different management systems in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.941-946, 2015.
- BARTA, J.R.; SCHRENZEL, M.D.; CARRENO, R.; RIDEOUT, B.A. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **Journal of Parasitology**, v.91, n.3, p.726-727, 2005.
- BOWMAN, D. **Georgis, Parasitology for Veterinarians**. 9ª Edição. St. Louis Missouri: Saunders, 2009.
- BOWMAN, D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2010.
- CALDERARO, F.F. Caracterização morfológica das lesões intestinais na coccidiose em leitões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1997, Foz do Iguaçu. **Anais...** Comitê Científico do 8º Congresso da ABRAVES, 1997. p.207.
- CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CARRENO, R.A.; SCHNITZLER, B.E.; JEFFRIES, A.C.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M.; BARTA, J.R. Phylogenetic analysis of coccidian based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p.184-188, 1998.

D'ALENCAR, A.S.; FAUSTINO, M.A.G.; SOUSA, D.P.; de LIMA, M.M; ALVES, L.C. Infecção por helmintos e coccídios em criação de suínos de sistema confinado localizada no município de Camaragibe-PE. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, p.79-86, 2006.

DAUGSCHIES, A.; BIALEK, R.; JOACHIM, A.; MUNDT, H.C.; Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs, and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine faeces. **Parasitology Research**, v.87, p.409-412, 2001.

DE PAIVA, D. P. **Suinocultura dinâmica – Isosporose suína**. Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA. 1996.

DUBEY, J.P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi: 1879) in cats and mice. **Journal of Protozoology**, v.26, n.3, p.433-443, 1979.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Extra-intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, n.1, p.89-92, 1972.

ESPÍNDOLA, C. J. Tecnologia e novas relações de trabalho nas agroindústrias de carne do Sul do Brasil. **Scripta Nova: Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales**, v.6, n.119, p.85, 2002.

FRANZEN, C.; MULLER, A.; BIALEK, R.; DIEHL, V.; SALZBERGER, B.; FATKENHEUER, G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. **Parasitology Research**, v.86, n.8, p.669-676, 2000.

FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidian. **Parasitology Research**. v.91, p.384-389, 2003.

FRENKEL, J.K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidian. **Journal of Parasitology**. v.63, p.611-628, 1977.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Rodents as vectors for feline Coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. **Journal of Infectious Diseases**, v.125, n.1, p.69-72, 1972.

GABNER, S.; WORLICZEK, H.L.; WITTER, K.; MEYER, F.R.L.; GERNER, W.; JOACHIM, A. Immune response to *Cystoisospora suis* in piglets. Local and systemic changes in T-cell subsets and selected mRNA transcripts in the small intestine. **Parasite Immunology**, v.36, p.277-291, 2014.

GREGORI, F., BRANDÃO, P.E., ROSALES, C.A.R., CORTEZ, A., HEINEMANN, M.B., RICHTZENHAIN, L.J., JEREZ, J.A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.191-194, 2000.

GUALDI, V.; VEZZOLI, F.; LUINI, M.; NISOLI, L. Efficacy of Baycox 5% and impact of coccidiosis due to *Isospora suis* on the growth of suckling piglets. In: **Proceedings 18th IPVS Congress**, v.1, p.269, 2003.

HABERKORN, A.; MUNDT, H.C. Untersuchungen an einem vielseitig einsetzbaren kokzidiotherapeutikum. **Prakt Tierarzt**, v.4, p.46-51, 1988.

JESUS, L.P., MÜLLER, G. Helminthos parasitos do estômago de suínos na região de pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.2, p.181-187, 2000.

JOACHIM A.; MUNDT, H.C. Efficacy of sulfonamides and Baycox® against *Isospora suis* in experimental infections of suckling piglets. **Parasitology Research**, v.109, p.1653–1659, 2011.

JOACHIM A.; SCHWARZ, L. Coccidia of Swine: Eimeria Species, Cystoisospora (syn. *Isospora*) suis. **H. Mehlhorn (ed.), Encyclopedia of Parasitology**, p. 1-5, 2015.

JOACHIM, A.; RUTTKOWSKI, B.; ZIMMERMANN, M.; DAUGSCHIES, A.; MUNDT, H.C. Detection of *Isospora suis* in piglet faeces – comparison of microscopy and PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p.140- 142, 2004.

JOACHIM, A.; SCHWARZ, L.; HINNEY, B.; RUTTKOWSKI, B.; VOGL, C.; MUNDT, H.C. Which factors influence the outcome of experimental infection with *Cystoisospora suis*? **Parasitology Research**, v.113, p.1863-1873, 2014.

JOHNSON, J.; SAMARASINGHE, B.; BUDDLE, R.; ARMSON, A.; RYAN, U. Molecular identification and prevalence of *Isospora sp.* in pigs in Western Australia using a PCR-RFLP assay. **Experimental Parasitology**, v.120, p.191-193, 2008.

KARAMON, J.; ZIOMKO, I.; CENCEK, T. Detection of *Isospora suis* coproantigens using indirect sandwich ELISA-a preliminary study. **Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.541, 2007.

KOUDELA, B.; KOUČEROVÁ, S. Immunity against *Isospora suis* in nursing pigs. **Parasitology Research**, v.86, p.861-863, 2000.

KREINER, T.; WORLICZEK, H.L.; TICHY, A.; JOACHIM, A. Influence of toltrazuril treatment on parasitological parameters and health performance of piglets in the field – an Austrian experience. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.14–20, 2011.

- LAI, M.; ZHOU, R.Q.; HUANG, H.C.; HU, S.J. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.121-124, 2011.
- LANGKJÆR, M.; ROEPSTORFF, A. Survival of *Isospora suis* oocysts under controlled environmental conditions. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.186–193, 2008.
- LEÓN, J.C.P. Prevalencia de *Isospora suis* en granjas porcinas intensivas ubicadas en el estado Aragua, Venezuela. **Zootecnia Trop.**, v.27, p.205-213, 2009.
- LEÓN, J.C.P.; BORGES, N.S. Prevalencia de *Cystoisospora suis* en lechones lactantes y cerdas en Venezuela. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.29, p.270-277, 2018.
- LEVINE, N.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Vol's I and II. Florida: **CRC press**, 1988.
- LEYTON, A.; WEBSTER, E.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; VILAÇA, K.; PEREGRINE, A. An observational study on the prevalence and impact of *Isospora suis* in suckling piglets in southwestern Ontario, and risk factors for shedding oocysts. **Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.184-188, 2011.
- LINDSAY et al. Coccidia and other protozoa. **Disease of Swine**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.655-667.
- LINDSAY, D.; DUBEY, J. Coccidia and other protozoa. In: Straw BE, *et al* editors. **Diseases of swine**. 9. ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University, 2005. p.861–73.
- LINDSAY, D.S.; CURRENTM W.L.; TAYLOR, J.R. Effects of experimentally induced *Isospora suis* infection on morbidity, mortality, and weight gains in nursing pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1511–1512, 1985.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.1, p.19–34, 1997.
- LINHARES, G.F.C.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; BARCELLOS, D.; MORENO, A.M.; MATOS, M.P.C. **Doenças dos Suínos**. 2ª Edição. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012.
- LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M.; MARQUES, S.M.T.; PAESI, S.O.; ALMEIDA, L.L.; MORENO, A.M.; CORBELLINI, L.G.; BARCELLOS, D.E.S.N. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.505–10, 2011.

MAES, D.; VYT, P.; RABAES, P.; GEVAERT, D. Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. **The Veterinary Journal**. v.173, p.197-199, 2007.

MARTINEAU, G.P.; CASTILLO, J. Epidemiological, clinical and control in investigations on field porcine coccidiosis: clinical, epidemiological and parasitological paradigms? **Parasitology Research**, v.86, p. 834-837, 2000.

MATSUBAYASHI, M., CARRENO, R.A.; TANI, H.; YOSHIUCHI, R.; KANAI, T.; KIMATA, I.; UNI, S.; FURUYA, M.; SASAI, K. Phylogenetic identification of *Cystoisospora* spp. from dogs, cats, and raccoon dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.270–274, 2011.

MENGEL, H.; KRÜGER, M.; KRÜGER, M.U.; WESTPHAL, B.; SWIDSINSKI, A.; SCHWARZ, S.; MUNDT, H.C.; DITTMAR, K.; DAUGSCHIES, A. Necrotic enteritis due to simultaneous infection with *Isospora suis* and clostridia in newborn piglets and its prevention by early treatment with toltrazuril. **Parasitology Research**, v.110, p.1347-1355, 2012.

MEYER, C.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A. Occurrence of *Isospora suis* in larger piglet production units and on specialized piglet rearing farms. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p.277–284, 1999.

MORA, L.M.O. Programa de desparasitación em porcino, valoración y eficacia. **Anaporc**, v.201, p.5-20, 2000.

MORENO, A.M.; LINHARES, G.F.C.; SOBESTIANSKY, J. Endoparasitoses. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.373-377.

MOTA, M de A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. V. de. Controle biológico de helmintos de parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MUNDT, H.C.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A.; ZIMMERMANN, M. Population biology studies on *Isospora suis* in piglets. **Parasitology Research**, v.90, p.158–159, 2003.

MUNDT, H. C., COHNEN, A., DAUGSCHIES, A., JOACHIM, A., PROSL, H., SCHMÄSCHKE, R., WESTPHAL, B. Occurrence of *Isospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. *Journal of Veterinary Medicine*. v. 52, p. 93-97, 2005.

MUNDT, H.C.; JOACHIM, A.; BECKA, M.; DAUGSCHIES, A. *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. **Parasitology Research**, v.98, p.167-175, 2006.

- MUNDT, H.C.; MUNDT-WÜSTENBERG, S.; DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A. Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. **Parasitology Research**, v.100, p.401-411, 2007.
- NECHT, D.; POPIOLEK, M.; ZALESNY, G. Does meatness of pig depend on the level of gastro-intestinal parasites infection? **Preventive Veterinary Medicine**, v.99, p.234-239, 2011.
- NIESTRATH, M.; TAKLA, M.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A. The role of *Isospora suis* as a pathogen in conventional piglet production in Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.49, p.176-180, 2002.
- NISHI, S. M.; GENNARI, S. M.; LISBOA, M. N. T. S.; SILVESTRIM, A.; CAPRONI, L. Jr.; HUMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.67, n.2, p.199-203, 2000.
- PENGFEI, H.; JIANHUA, L.; PENGTAO, G.; JINGUI, H.; XICHEN, Z. *Cystoisospora* spp. from dogs in China and phylogenetic analysis of its 18S and ITS1 gene. **Veterinary Parasitology**, v.190, p.254-258, 2012.
- PETTERSSON, E.; HESTAD, S.; MÖTTUS, I.; SKIÖLDEBRAND, E.; WALLGREN, P. Rotavirus and *Cystoisospora suis* in piglets during the suckling and early post weaning period, in systems with solid floors and age segregated rearing. **Porcine Health Management**, n.5, v.7, p.1-10, 2019.
- PIGI. Parasite Alert. **Pig International**, v.37, n.3, p.25-26, 2007.
- PINTO, J.M.S.; COSTA, J.O.; SOUZA, J.C.A. Ocorrência de endoparasitos em suínos criados em Itabuna, Bahia, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.10, p.79-85, 2007.
- REBOUÇAS, M.M.; OLIVEIRA, S.; FILHA, E.S.; SANTOS, S.M.; AMARAL, V. *Isospora suis* em suínos no estado de São Paulo – Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, p.137-140, 1992.
Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.
- ROSTAGNO, M. H.; BICALHO, K. A.; LAGE, A. P. Prevalência de *Isospora suis* em leitões de granjas comerciais de ciclo completo. In: **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**, 9. Belo Horizonte - MG. Anais., p. 195-196, 1999.
- RUIZ, V.L.A.; BERSANO, J.G.; CARVALHO, A.F.; CATROXO, M.H.B.; CHIEBAOD.P.; GREGORI, F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; OGATA, R.A.; SCARCELLI, E.P.; TONIETTI, P.O. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. **BMC Research Notes**, v.9, p.22, 2016.

- RYPULA, K.; POROWSKI, M.; KABA, J.; GORCZYKOWSKI, M.; DENIZ, A. Effect of Isosporiasis Prevention with Toltrazuril on Long-Term Pig Performance. *The Scientific World Journal*, p.1-4, 2012.
- SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCRRFLP assay. **Experimental Parasitology**. v.118, p.592-595, 2008.
- SANTOS, N.M.; LOPES, C.W.G. Morfologia dos oocistos das espécies da família Eimeriidae Minchin, 1903 (Protozoa: Apicomplexa) parasitos de suínos. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**. v.3, n.2, p.41-44, 1988.
- SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; DE SOUZA, A.P.; CANTELLI, C.R. Prevalência das espécies de Eimeria Schneider, 1875 e *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de suínos do município de Videira, SC, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.6, n.1, p. 38-43, 2007.
- SCALA, A., DEMONTIS, F., VARCASIA, A., PIPIA, A.P., POGLAYEN, G., FERRARI, N., GENCHI, M. Toltrazuril and sulphonamide treatment against naturally *Isospora suis* infected suckling piglets: Is there an actual profit? **Veterinary Parasitology**. v.163, p. 362- 365, 2009.
- SCHNEIDER, A. Sur les psorospermies oviformes ou coccidies. Espèces nouvelles ou peu connues. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, v.9, p. 387-404, 1881.
- SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 36, n.4, p.266-275, 1923.
- SHRESTHA, A.; FREUDENSCHUSS, B.; SCHWARZ, L.; JOACHIM, A. Development and application of a recombinant protein-based indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Cystoisospora suis* in swine, **Veterinary Parasitology**, v.258, p.57-63, 2018.
- SILVA, C.A., BRITO, B.G., M, N., AMARAL, A.L. Fatores de risco relacionados com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos da região norte do Paraná. **Ciência Rural**, v.28, n.4, 677-681, 1998.
- SILVA, R. J. da. Enrofloxacin e toltrazuril reduzem a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilos placentários humanos de terceiro trimestre. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**. 76 p. 2016.

SIMEPAR – Sistema Meteorológico do Paraná. **Dados meteorológicos de Palotina –PR**. Acesso em: 15 de fev. 2019.

SKAMPARDONIS, V.; SOTIRAKI, S.; KOSTOULASA, P.; LONTIDES, L. Effect of toltrazuril treatment in nursing piglets naturally infected with *Isospora suis*. **Veterinary Parasitology**, v.172, p. 46–52, 2010.

SKAMPARDONIS, V.; SOTIRAKI, S.; KOSTOULAS, P.; LEONTIDES, L. Factors associated with the occurrence and level of *Isospora suis* oocyst excretion in nursing piglets of Greek farrow-to-finish herds. **Veterinary Research**, v. 8, p. 9, 2012.

SOBESTIANSKY, J., WENTZ, I., SILVEIRA, P.R.S., SESTI, L.A.C. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.388, 1998.

SOTIRAKI, S.; ROEPSTORFF, A.; NIELSEN, J. P.; MADDOX-HYTTEL, C.; ENØE, C.; BOES, J.; MURRELL, K.D.; THAMSBORG, S. M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. **Parasitology**, v.135, p.395–405. 2008.

SOTIRAKI, S.; ROEPSTORFF, A.; NIELSEN, J.P.; MADDOX-HYTTEL, C.; ENØE, C.; BOES, J.; MURRELL, K.D.; THAMSBORG, S. M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. **Parasitology**, v. 135, p. 395 – 405, 2018.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. Ed. Guanabara-Koogan, p.495-496, 2002.

STUART, B.P.; GOSSER, H.S.; ALLEN, C.B.; BEDELL, D.M. Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isospora suis*. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.46, p.317-320, 1982.

STUART, B.P.; LINDSAY, D.S. Coccidiosis in swine. Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v.2, p. 455–468, 1986.

STUART, B.P.; LINDSAY, D.S.; ERNST, J.V.; GOSSER, H.S. *Isospora suis* enteritis in piglets. **Veterinary Pathology**, v.17, p.84–93, 1980.

VÍTOVEC, J.; KOUDELA, B.; KUDWEIS, M.; STĚPÁNEK, J.; SMÍD, B.; DVORÁK, R. Pathogenesis of experimental combined infections with *Isospora suis* and rotavirus in conventional and gnotobiotic piglets, **Zbl. Veterinary Medicine B.**, v.38, p.215-226, 1991.

WENYON, C.M. Protozoology. William, **Wood and Company, NewYork**. v.2, p.1396, 1926.

WESTPHAL, B.; BERNEMANN, U.; KATHMANN, L. *Isospora suis* and *Clostridium perfringens* as mixed infection in suckling piglets just after post partum? **Tierärztl Umschau**, v.62, p.682, 2007.

WORLICZEK, H.L.; JOACHIM, A. Neonatal Porcine Coccidiosis Mehlhorn (Ed.), **Progress in Parasitology, Parasitol. Res. Monographs, Springer**, Berlin Heidelberg, v.2, p.79-91, 2011.

WORLICZEK, H.L.; MUNDT, H.C.; RUTTKOWSKI, B.; JOACHIM, A. Age, not infection dose, determines the outcome of *Isospora suis* infections in suckling piglets. **Parasitology Research**, v.105, p.157–162, 2009.

ZHANG, W.J.; XU, L.H.; LIU, Y.Y.; XIONG, B.Q.; ZHANG, Q.L.; LI, F.C.; SONG, Q.Q.; KHAN, M.K.; ZHOU, Y.Q.; HU, M.; ZHAO, J. Prevalence of coccidian infection in suckling piglets in China. **Veterinary Parasitology**. v.190, p.1-2, 2012.

ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W. **Diseases of swine**. 10. New York: Wiley, 2012.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, DESN. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.81–86, 2008.

7 APÊNDICES

Apêndice A: Sala de maternidade em uma granja suinícola no município de Palotina-PR.



Apêndice B: Score de excreção dos oocistos.

Média de oocistos por campo de visão	Score
$0 < x \leq 2$	+
$2 < x \leq 5$	++
$5 < x \leq 10$	+++
> 10	++++

FONTE: Mengel et al. (2012)

Apêndice C: Acta Tropica: Author Information Pack



ACTA TROPICA

TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.2
- **Impact Factor** p.2
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.4

AUTHOR INFORMATION PACK



ISSN: 0001-706X

DESCRIPTION

Acta Tropica, is an international journal on infectious diseases that covers public health sciences and biomedical research with particular emphasis on topics relevant to human and animal health in the tropics and the subtropics.

Its scope includes the biology of pathogens and vectors, host-parasite relationships, mechanisms of pathogenicity, clinical disease and treatment, and we welcome contributions in basic or applied research in disciplines such as epidemiology, disease ecology, diagnostics, interventions and control, mathematical modeling, public health and social sciences, climate change, parasite and vector taxonomy, host and parasite genomics, biochemistry and immunology and vaccine testing.

Contributions may be in the form of original papers, review articles or short communications.

Only manuscripts of high scientific significance and innovation will be considered for publication. Manuscripts of minimal international relevance, case reports, and control strategies at very early inconclusive laboratory stages of development will not be considered for publication.

Important Guidelines for Acceptance

Editors and the Editorial Board of *Acta Tropica* provide the following guidelines to help authors prepare manuscripts of high quality that can be considered for publication. Maximize your chances of acceptance by making sure your manuscript: Matches the scientific scope of the journal, Presents results that significantly advance science including innovative new approaches, Meets quality standards of presentation and literature citation, Demonstrates potential health or biomedical impact.

The above points are critical for publication of original papers. Be aware Editors carefully evaluate initial manuscript submissions and only those meeting the above criteria will be forwarded to review. If reviewed favorably and the authors seriously address all concerns, than chances of acceptance are increased. Review papers, in addition, are expected to carefully synthesize the literature and make recommendations to advance respective scientific fields.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#) .

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

All clinicians and researchers dealing with tropical diseases, including parasitologists, microbiologists, immunologists and epidemiologists

IMPACT FACTOR

2017: 2.509 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Chemical Abstracts
 Current Contents
 EMBASE
 MEDLINE®
 Science Citation Index
 Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
 Helminthological Abstracts
 Tropical Diseases Bulletin
 Veterinary Bulletin
 Ecological Abstracts
 CAB Abstracts
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

J. Beier, Division of Environment & Public Health Department, Public Health Sciences University, University of Miami, Miller School of Medicine, Clinical Research Building, 1120 NW 14th Street, Miami, 33136, USA, Fax: +1 305 256 1306

G. Benelli, Dept. of Agriculture, Food and Environment, Università di Pisa, Via del Borghetto 80, 56124, Pisa, Italy

N.W. Brattig, Tropical Medicine Section, Bernhard Nocht Inst., Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359, Hamburg, Germany, Fax: +49 40 42818 400

F. Guhl, Microbiological and Parasitological Centre (CIMPAT) Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Universidad de Los Andes, Calle 18 A No. 0 - 33, 111711, Bogotá, Colombia, Fax: 57 1 2841890

Editorial Board

P. Adler, Clemson, South Carolina, USA

R. Bergquist

K. Berzins, Stockholm, Sweden

F. Bruschi, Pisa, Italy

D. Campbell, Los Angeles, CA

J.M. Cordovez, Bogota, Colombia

J.T. Coulibaly, Abidjan, Côte d'Ivoire

P. Dorny, Ghent, Belgium

A. Flisser-Steinbruch, Mexico City, Mexico

R. Gürtler, Buenos Aires, Argentina

J. Hargrove, Stellenbosch, South Africa

A. Hassanali, Nairobi, Kenya

C. Hatz, Basel, Switzerland

A. Ito, Hokkaido, Japan

N. Kabatereine, Kampala, Uganda

C. H. King, Cleveland, OH

I. Krantz, Skövde, Sweden

A. Kumar, Goa, India

N. Kumar, Miami, Florida, USA

L.R. Leonardo, Manila, Philippines
A.G. Lescano, New Orleans, LA
H. Madsen, Copenhagen, Denmark
F. Maggi, Camerino, Italy
S. Manguin, Montpellier, France
S. Mas-Coma, Valencia, Spain
D.P. McManus, Brisbane, Queensland, Australia
G. Muller, Jerusalem, Israel
F. Ntoumi, Brazzaville, Congo
D. Otranto, Bari, Italy
R. Pavela, Ruzyne, Czech Republic
P.V. Perkins, Orrington, Maine, USA
K.D. Ramaiah, Pondicherry, India
C.T.D. Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil
L. Rombo, Eskilstuna, Sweden
N. Saravia, Cali, Colombia
S. Sayasone, Basel, Switzerland
G. Schaub, Bochum, Germany
L. Shan, Shanghai, China
B. Sripa, Khon Kaen, Thailand
P. Steinmann, Basel, Switzerland
J.R. Stothard, Liverpool, England, UK
S.R. Telford, North Grafton, Massachusetts, USA
J. Utzinger, Basel, Switzerland
G. Vallejo, Ibague, Colombia
J. Vontas, Heraklion, Crete, Greece
M. Wahlgren, Solna, Sweden
J. Waikagul, Bangkok, Thailand
M. Walker, London, UK
M.L. Wilson, Ann Arbor, Michigan, USA
R.-D. Xue, St. Augustine, Florida, USA
S. Zakeri, Tehran, Iran
B. Zhan, Houston, TX
E. Zhioua, Tunis, Tunisia
X.-N. Zhou, Shanghai, China
B. Zingales, Sao Paulo - SP, Brazil

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Acta Tropica publishes original research papers, short communications, review articles and letter to the editor. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors. Letters to the Editor is considered for publication provided it does not contain material that has been submitted or published elsewhere. The text, not including references, must not exceed 1000 words. The letter can have one figure or small table. When a letter refers to an article recently published in *Acta Tropica*, the opportunity for reply will be given to the authors of the original article. Such a reply will be published along with the letter. Start the letter with "Dear Editor".

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2350**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses of at least 3 potential reviewers for this manuscript meeting the following criteria: They must be experts or active workers in the field; They must not be from the same university; They must not be current or prior mentors or collaborators;

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-tropica>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate

image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>