



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EVERTON ANDRÉ DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TILÁPIAS DO NILO NA ELIMINAÇÃO DE  
OVOS DE *Toxocara canis* PARA O MEIO AMBIENTE**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EVERTON ANDRÉ DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TILÁPIAS DO NILO NA ELIMINAÇÃO DE  
OVOS DE *Toxocara canis* PARA O MEIO AMBIENTE**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia e Saúde Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém

639.3  
O48a

Oliveira, Everton André de.

Avaliação do potencial de tilápias do Nilo na eliminação de ovos de *Toxocara canis* para o meio ambiente / Everton André de Oliveira. – Presidente Prudente, 2019.

44f.: il.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Vamilton Alves Santarém

1. Contaminação ambiental. 2. Peixe. 3. Toxicocariase. 4. Transmissão. 5. Zoonose. I. Título.

**EVERTON ANDRÉ DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TILÁPIAS DO NILO NA ELIMINAÇÃO DE  
OVOS DE *Toxocara canis* PARA O MEIO AMBIENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 25 de junho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva  
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS  
Feira de Santana - BA

---

Prof. Dr. Rogerio Giuffrida  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste  
Presidente Prudente – SP

## DEDICATÓRIA

*A Deus que guiou e abençoou a minha vida, dando força, sabedoria e coragem para realizar mais esse sonho.*

*A uma mulher lutadora e guerreira que não mediu esforços para que eu concluísse esse projeto e que sempre dedicou a sua vida a cuidar e proteger seus filhos: minha amada mãe Zenilde Rita de Oliveria Camilo.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, a minha mãe Zenilde Rita Oliveira Camilo, minha irmã Rosemeire Aparecida Camilo, meu irmão Erontides de Oliveira Camilo, minha cunhada Luciana de Paula e meus sobrinho, os príncipes: Guilherme, Gabriel, Vitor e minha princesa Júlia por todo o incentivo e compreensão durante meus estudos e por sempre estarem ao meu lado.*

*Agradeço, em especial ao meu orientador, Vamilton Alvares Santarém, por estar sempre presente nos momentos em que precisei, por ter me ensinado além do conhecimento acadêmico, valores que levarei comigo, como a essência da simplicidade, humildade, carinho e respeito ao próximo.*

*Agradeço a professora Rosemeire Souza Santos, pelo empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa e pela paciência com ensinamentos que sempre eram seguidos de palavras de carinho e motivação.*

*As minhas amigas de pesquisa Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti, Isabele Santos Garcia e Isabella Braghin Ferreira, que me ajudaram e dividiram momentos de alegrias durante o projeto de pesquisa.*

*Agradeço a Professora Cecília Laposy e o Professor Rogerio Giuffrida pela convivência nos laboratórios e conhecimentos transmitidos.*

*Agradeço as funcionárias dos Laboratórios do Hospital Veterinário, Sidenir Aparecida Braz, Ana Maria Siqueira Silveira, Lídian Aparecida da Silva, a residente Marina P. S. Fraga, e aos funcionários do Setor de Piscicultura da Unoeste Giovane P. Figueiredo, Jessica Aparecida O. Magalhães e Mauro S. Corazza, por toda a ajuda, atenção e profissionalismo durante o desenvolvimento da pesquisa.*

*“O importante não é a magnitude de nossas ações, mais  
sim a quantidade de amor que é colocada nelas”.*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## RESUMO

### **Avaliação do potencial de tilápias do Nilo na eliminação de ovos de *Toxocara canis* para o meio ambiente**

A cultura do consumo de carne de peixe cru vem se disseminando pelo mundo, e com isso cresce também o número de casos de zoonoses causadas por agentes parasitários que utilizam os peixes como hospedeiros. Embora a toxocaríase seja primariamente uma geozoonose, sua transmissão também é passível pelo consumo de carne crua ou mal cozida de hospedeiros paratênicos. Nos humanos as larvas migram do intestino delgado para diversos órgãos, mas o ciclo de vida do parasita não se completa. Na literatura são escassos os estudos sobre o papel dos peixes na cadeia epidemiológica da doença. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de peixes em promover a dispersão de ovos de *Toxocara canis* no meio aquático e verificar a migração de larvas para os órgãos (fígado, trato gastrintestinal (TGI), olhos, sistema nervoso central) e na musculatura de peixes, usando como modelo experimental a tilápia do Nilo. Os peixes (n=15) foram inoculados experimentalmente por gavagem com 300 ovos embrionados de *T. canis*, e mantidos individualmente em caixas plásticas durante o experimento. A avaliação da contaminação da água, foi realizada pela filtragem seriada em um conjunto de tamises (212 e 38  $\mu\text{m}$ ), onde os sedimentos retidos foram recuperados e analisados em microscopia. A avaliação da migração tecidual, foi feita por digestão ácida dos órgãos, realizadas nos tempos de 16, 24, 48, 72 e 240 horas pós-inoculação. Em cada momento, foram analisados três peixes inoculados e um peixe do grupo controle (Grupo controle n= 5). A recuperação total de ovos no experimento foi de 48,4%, sendo que, das estruturas parasitárias 76,3% estavam meio aquático e 23,7% no TIG. O modelo de regressão binomial negativo mostrou declínio significativo tanto da eliminação de ovos embrionados para o meio aquático ( $p= 0,001$ ) quanto na presença de ovos de *T. canis* no TGI dos peixes ( $p=0,007$ ), ao longo do tempo. Nenhuma larva foi recuperada dos tecidos. Os dados do estudo mostram que peixes são proficientes em eliminar ovos de *Toxocara canis* em ambiente aquático, e que embora não haja migração tecidual, os peixes podem manter ovos aparentemente infectivos de *Toxocara canis* no trato gastrintestinal. Desta forma, torna-se necessário a adoção de práticas adequadas de manejo com treinamentos regulares para os trabalhadores da cadeia produtiva e manipuladores de pescados para minimizar os impactos das zoonoses transmitidas por peixes.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental, peixe, toxocaríase, transmissão, zoonose.



## ABSTRACT

### Evaluating the potential of Nile tilapia to release *Toxocara canis* eggs to the environment

The culture of the consumption of raw fish flesh is spreading around the world, and with this also increases the number of cases of zoonoses caused by parasitic agents that use the fish as hosts. Although toxocariasis is primarily a geozoonosis, its transmission is also amenable to the consumption of raw or undercooked meat from paratenic hosts. In humans the larvae migrate from the small intestine to various organs, but the life cycle of the parasite is not complete. There is a scarcity of studies about role of fish in the epidemiological chain of the disease. The objective of this study is to evaluate the ability of fish to promote the dispersion of *Toxocara canis* eggs in the aquatic environment and to verify the migration of larvae to the organs (liver, gastrointestinal tract (TGI), eyes, central nervous system) and in the musculature of using Nile tilapia as the experimental model. The fish (n = 15) was inoculated experimentally by gavage with 300 embryonic eggs of *T. canis*, and kept individually in plastic boxes during the experiment. The evaluation of the water contamination was performed by serial filtration in a set of sieves (212 and 38  $\mu\text{m}$ ), where the retained sediments were recovered and analyzed by microscopy. The evaluation of the tissue migration was made by acid digestion of the organs, performed at 16, 24, 48, 72 and 240 hours after inoculation. At each moment, three inoculated fish and one fish of the control group were analyzed (Control Group n = 5). The total egg recovery in the experiment was 48.4%, and 76.3% of the parasitic structures were aquatic and 23.7% in TIG. The negative binomial regression model showed a significant decline in both the elimination of embryonated eggs into the aquatic environment ( $p = 0.001$ ) and in the presence of *T. canis* eggs in fish TGI ( $p = 0.007$ ) over time. No larvae was recovered from the tissues. The data show that fish are proficient at eliminating *T. canis* eggs in the aquatic environment, and that although there is no tissue migration, fish can maintain apparently infective eggs of *T. canis* in the gastrointestinal tract. Thus, it is necessary to adopt adequate management practices with regular training for workers in the chain of production and fish handling to minimize the impacts of zoonoses transmitted by fish.

**Key-words:** environmental contamination, fish, toxocariasis, transmission, zoonosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIC - Critério de Informação de Akaike

°C - Grau Celsius

cm - Centímetro

g - Gramas

*g* - Força centrífuga

GC - Grupo Controle

GI - Grupo inoculado

GLM – Modelo Linear Generalizado

IC 95% - Intervalo de Confiança

μL - Microlitros

μm - Micrômetro

mm - Milímetro

mg - Miligrama

n – Número amostral

NA - Não Avaliados

p - Significância Estatística

p ou p value – valor de p

p.i. - Pós Inoculação

rho – Coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman

% - Porcentagem

SNC - Sistema Nervoso Central

® - Marca Registrada

TGI - Trato Gastrointestinal

(\*) - Momentos de avaliação da liberação de ovos em meio aquático

(+) - Momentos de avaliação migração de larvas em tecidos

## SUMÁRIO

<b>1 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>13</b>
<b>ANEXO 1- NORMAS DA REVISTA PARASITOLOGY RESEARCH.....</b>	<b>34</b>

## 1 ARTIGO CIENTÍFICO\*

### **Avaliação do potencial de tilápias do Nilo na eliminação de ovos de *Toxocara canis* para o meio ambiente.**

Everton André de Oliveira<sup>1</sup>, Yslla Fernanda Fitz Balo Meriguetti<sup>1</sup>, Isabella Braghin Ferreira<sup>2</sup>, Isabele Santos Garcia<sup>2</sup>, Aline Soriano Pereira<sup>1</sup>, Rosemeire Souza Santos<sup>3</sup>, Rogerio Giuffrida<sup>1</sup>, Vamilton Alvares Santarém<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia Veterinária, Hospital Universitário (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Piscicultura (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

**Resumo**

O número de zoonoses causadas por agentes parasitários que tem os peixes como hospedeiros vem aumentando, assim como o consumo de peixes crus. A toxocaríase é uma doença zoonótica que pode ser transmitida através do consumo de carne crua ou mal cozida de hospedeiros paratênicos, mas há poucos estudos sobre o papel do peixe na cadeia epidemiológica da doença. Avaliou-se a liberação de ovos de *Toxocara canis* para o meio aquático e a migração de larvas dentro da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Peixes (n = 15) foram inoculados por gavagem com 300 ovos de *T. canis* embrionados, e um grupo controle (n = 5) recebeu água destilada. Os peixes foram mantidos individualmente e analisados 16, 24, 48, 72 e 240 horas após a inoculação, com três peixes inoculados e um controle avaliados em cada momento. A contaminação da água foi avaliada por filtração em série com peneiras de 212 e 38  $\mu\text{m}$ , e a migração de tecido no fígado, trato gastrointestinal, olhos e sistema nervoso central foi avaliada por digestão ácida. A tilápia do Nilo liberou os ovos de *T. canis* para o meio aquático. Os ovos embrionados pareciam manter-se infectivos no trato gastrointestinal dos peixes, mas nenhuma larva foi recuperada dos tecidos. Houve um declínio significativo ao longo do tempo tanto na liberação de ovos para o meio aquático quanto na presença de ovos no trato gastrointestinal dos peixes. Embora o consumo direto de tecidos de tilápia do Nilo não pareça representar um risco de transmissão de ovos de *T. canis*, os peixes infectados podem transmitir ovos desse nematódeo ao ambiente aquático.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental, peixe, toxocaríase, transmissão, zoonose.

## **Evaluating the potential of Nile tilapia to release *Toxocara canis* eggs to the environment**

### **Abstract**

The number of zoonotic diseases caused by parasitic agents with fish as hosts has been increasing, as has the consumption of raw fish. Toxocariasis is a zoonotic disease that can be transmitted through the consumption of raw or poorly cooked meat from paratenic hosts, but there are few studies on the role of fish in the epidemiological chain of the disease. We evaluated the release of *Toxocara canis* eggs to the aquatic environment and the migration of larvae within the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish (n=15) were inoculated by gavage with 300 embryonated *T. canis* eggs, and a control group (n=5) received distilled water. Fish were maintained individually and analysed 16, 24, 48, 72 and 240 hours after inoculation, with three inoculated and one control fish assessed at each time. Water contamination was assessed by serial filtering with 212- and 38- $\mu$ m sieves, and tissue migration in the liver, gastrointestinal tract, eyes, and central nervous system were assessed by acid digestion. Nile tilapia released *T. canis* eggs to the aquatic environment. The embryonated eggs appeared to maintain infectivity in the gastrointestinal tracts of fish, but no larvae were recovered from tissues. There was a significant decline over time in both the release of eggs to the aquatic environment and the presence of eggs in the gastrointestinal tract of fish. While direct consumption of Nile tilapia tissues does not appear to pose a risk of transmitting *T. canis* eggs, infected fish can transmit eggs produced by this nematoda to the aquatic environment.

**Keywords:** environmental contamination, fish, toxocariasis, transmission, zoonosis.

## Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe de água doce mais cultivada no mundo (Melo et al. 2016; El-Leithy et al. 2019) e o sucesso produtivo se deve ao rápido crescimento, rusticidade, hábito alimentar onívoro, resistência a baixas concentrações de oxigênio, facilidade de manejo, além de apresentar carne de sabor agradável e com poucas espinhas (FAO 2019).

Populações de vários países, em particular as da Ásia, têm como hábito cultural o consumo de carne de peixe cru ou inadequadamente cozido. Esta prática vem se disseminando e ganhando o gosto popular em todo o mundo (Macpherson 2005; Mehrdana e Buchmann 2017).

Vários agentes parasitários zoonóticos emergentes têm sido relacionados ao consumo de peixes e frutos do mar, como *Anisakis* spp. (Carbotta et al. 2016; Bao et al. 2017), *Gnathostoma* spp. (Cornaglia et al. 2016) e *Toxoplasma gondii* (Zhang et al. 2014; Sanders et al. 2015). Além do consumo da carne crua de pescados, existe o risco da contaminação cruzada durante a manipulação e preparo dos pratos à base de peixe (Tran et al. 2009).

Outras zoonoses têm sido associadas ao consumo de carne crua ou mal cozida de diferentes animais. Um exemplo é a toxocaríase, uma geozoonose, causada pelo parasita *Toxocara* spp., que pode ser transmitida pelo consumo de hospedeiros paratênicos como ovelhas (Salem e Schantz 1992), coelhos (Stürchler et al. 1990), bovino (Yoshikawa et al. 2008), frangos (Morimatsu et al. 2006) e avestruzes (Noh et al. 2012).

A toxocaríase é uma das zoonoses parasitárias de mais alta prevalência no mundo, particularmente em populações vulneráveis (Ma et al. 2018). Os humanos são hospedeiros acidentais de *Toxocara* spp., cuja infecção se dá primariamente pela ingestão de ovos embrionados presentes no solo ou pela ingestão de larvas em tecidos de hospedeiros paratênicos (Stube et al. 2013; Magnaval et al. 2001; Ma et al. 2018). As larvas migram para

o intestino delgado e deste para diversos órgãos, porém o ciclo de vida do parasita não se completa (Kyei et al. 2015; Krücken et al. 2017).

O papel dos peixes na cadeia epizootiológica de *Toxocara* spp. ainda é pouco conhecido. Taira et al. (2003) destacaram a importância em se elucidar a biologia de *T. canis* em animais utilizados como alimentação humana para prevenção da transmissão da doença.

A presença de animais de estimação próximos aos lagos, rios e tanques destinados a piscicultura podem resultar na eliminação de excretas na água e a transmissão de parasitos aos peixes (Thu et al. 2007). Conseqüentemente, a ingestão de vísceras e carne de peixes podem ser consumidos por cães e humanos (Nissen et al., 2014).

Diante deste panorama, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de peixes como agentes de eliminação de ovos de *T. canis* para o ambiente aquático, e verificar a migração tecidual das larvas.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado no setor Piscicultura do Centro Zootécnico da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), e seguiu as legislações sobre cuidados com animais de pesquisa e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, registrado sob Protocolo nº 4299.

## **Peixes**

A espécie *Oreochromis niloticus niloticus* (tilápias do Nilo) foi adotada como modelo experimental para peixe no presente estudo.

Um grupo de tilápias foi capturado de um tanque de criação de solo com uso de rede tarrafa. Os peixes foram transferidos para condições de laboratório, e mantidos em caixa de depuração com sistema de recirculação de água e oxigenação por aeração com compressor de



ar, permanecendo por um período de aclimatação de 7 dias (El-Leithy et al. 2019), até o momento da seleção de espécimes para inoculação experimental.

O estudo foi delineado para avaliar a eliminação de ovos de *T. canis* no meio aquático e a presença de larvas nos órgãos (fígado, trato gastrointestinal (TGI), olhos, sistema nervoso central) e na musculatura.

A avaliação da eliminação de ovos no meio aquático e a migração de larvas foi realizada 16, 24, 48, 72 e 240 horas pós-inoculação (p.i), com avaliação de 15 peixes inoculadas com 300 ovos embrionados de *T. canis* (GI) e um grupo controle (GC), de acordo com a tabela 1.

O tempo mínimo de trânsito intestinal de alimentos em tilápias é estimado em 16 horas (Carvalho et al. 2019). Desta forma, foram analisadas a água do aquário e tecidos de 3 peixes neste tempo. Para os demais peixes não foi realizada a coleta em 16h para evitar o estresse do manejo em um curto intervalo de tempo. Adotando-se as demais coleta a partir de 24 horas.

### **Obtenção de ovos de *Toxocara canis***

Os ovos de *T. canis* foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Pecinali et al. (2005), com pequenas modificações. Fêmeas adultas de *T. canis* foram recuperadas das fezes de filhotes de cães infectados naturalmente, lavadas com solução fisiológica e histerectomizadas. Os ovos obtidos foram incubados em solução de formalina 2%, por pelo menos 30 dias, em estufa incubadora ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Após o período de incubação e observação do embrionamento dos ovos, o material foi lavado com solução fisiológica e centrifugado (697g) por 3 minutos. Os ovos embrionados foram dispostos em lâmina histológica para contagem de 300 unidades (Santos et al. 2017). Após a contagem, os ovos foram transferidos para tubos plásticos contendo 20  $\mu\text{L}$  de água destilada.

### **Inoculação dos Peixes**

Após o período de aclimatação, foi realizada a seleção de 20 peixes para o estudo experimental, adotando-se os critérios de inclusão: espécimes com até 10 cm de comprimento, peso entre 20 e 30 gramas, e idade estimada de três meses. Para essa finalidade, os peixes foram capturados da caixa de depuração com ajuda de rede puçá (10X10 cm).

Após a captura, cada peixe foi sedado por imersão em solução anestésica (50 mg de benzocaína diluída em etanol) até a perda do equilíbrio (Neiffer e Stamper 2009). Após a constatação da sedação, cada peixe foi inoculado, por via oral, com 300 ovos embrionados de *T. canis*, com auxílio de agulha de gavagem recomendada para uso em camundongos (Pecinali et al. 2005). Para assegurar a passagem pela agulha e ingestão total dos ovos embrionados, foram administrados mais 20 µL de água destilada. A recuperação total da sedação foi considerada com retorno da estabilização do equilíbrio e resposta a estímulos externos.

Após a inoculação, os peixes foram alocados, individualmente, em caixas de polietileno com capacidade de 5 litros de água, onde permaneceram durante todo o estudo.

Os peixes do grupo controle receberam 40 µL de água destilada, por via oral, com o objetivo de reproduzir as mesmas condições de manejo dos peixes inoculados.

Os peixes foram mantidos individualmente durante todo o experimento em ambiente controlado com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro à temperatura de 25±5°C com oxigenação constante por meio de aeração com compressor de ar. Foram alimentadas duas vezes ao dia até aparente saciedade com ração comercial para peixes (Acqua 32 Matsuda<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil).

### **Avaliação da eliminação de ovos no meio aquático**

Para análise e recuperação de ovos de *T. canis*, a água do aquário foi filtrada em um conjunto de tamises metálicos com malhas de 212  $\mu\text{m}$  e 38  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

O material retido em cada tamise foi coletado com auxílio de pipeta plástica, transferido para tubo de fundo cônico (15 ml) e centrifugado (697g; 3 minutos) para concentração dos sedimentos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e todo sedimento observado entre lâmina e lamínula (24x50mm) em microscópio ótico (10x e 40x) para quantificar os ovos recuperados.

Entre cada momento de avaliação (Tabela 1), os peixes foram transferidos para uma nova caixa com água limpa. A transferência possibilitou a filtragem de toda a água e dejetos. Além disso, foi realizada lavagem com água abundante e filtragem para obtenção de ovos aderidos nas paredes da caixa.

### **Avaliação da migração de larvas de *T. canis***

Após a inoculação dos peixes (momento 0), três animais do grupo inoculado e um do GC foram avaliados com 16, 24, 48, 72 e 240 horas pós-inoculação (tabela 1), para análise dos tecidos e pesquisa de migração das larvas.

Os peixes foram imersos em solução anestésica (50 mg de benzocaína diluída em etanol), seguindo o protocolo descrito por Neiffer e Stamper (2009). Os peixes foram mortos por secção medular, quando verificou-se ausência do movimento opercular e permanência estática no fundo do aquário após anestesia (Pedrazzani et al. 2007).

Os peixes foram seccionados com auxílio de pinças e bisturis para extração do fígado, estômago, intestino, brânquias, olhos, SNC, e musculatura (porção lateral do peixe).

Cada órgão foi triturado individualmente sobre placas de Petri e submetidos ao processo de digestão ácida (5g de pepsina, 10 ml HCl a 37%, em água destilada) permanecendo por 6

horas a 37°C sob agitação (Azizi et al. 2007). Após o processo de digestão, o material foi filtrado em tamise de 300 µm e centrifugado (697g) por 3 minutos.

A pesquisa de ovos e de larvas no trato intestinal (estômago e intestino) e de larvas nos demais tecidos foi realizada com análise total dos sedimentos, por microscopia ótica (40x e 10x), entre lâmina e lamínula.

### **Análise estatística**

Para análise da dispersão, assumiu-se que a concentração de ovos nos peixes e no ambiente aquático poderiam ser descritas por uma distribuição de Poisson ou binomial negativa (Wilson e Grenfell 1997; Alexander 2012). Dessa forma, propôs-se um modelo linear generalizado, no qual a variável dependente foi a contagem de estruturas parasitárias e o tempo em horas como independente. Foi observado que as contagens de estruturas parasitárias se apresentaram superdispersas. Diante desse cenário, optou-se pela distribuição binomial negativa para descrever os dados (Liboschik et al. 2017)

A análise de correlação não paramétrica de Spearman foi empregada para avaliar a relação entre a contagem de estruturas parasitárias nos peixes e na água do aquário (acumulada para todos os momentos avaliados).

Os valores de  $P$  menores que 0.05 foram considerados estatisticamente. A análise estatística foi realizada com emprego do Software R (R Development Core Team, 2019).

### **Resultados**

No presente estudo, verificou-se que o índice de recuperação de estruturas parasitárias por peixe, incluindo os ovos liberados e retidos no TGI, variou de 23% a 86% (média= 48,4%). No meio aquático e no TIG foram recuperadas, respectivamente, 76,3% e 23,7% das estruturas parasitárias.

A eliminação de ovos embrionados foi detectada 16 horas pós-inoculação (p.i.) e se manteve até 240 horas (p.i.), quando do término das avaliações.

Verificou-se que a contagem de estruturas parasitárias (ovos ou larvas) observadas no TGI dos peixes foi negativamente correlacionada com a quantidade de estruturas parasitárias identificadas na água do aquário (Coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman ( $\rho$ ) = -0.698, IC 95% = -91 à -25,  $p = 0.003$ ).

O modelo de regressão mostrou o declínio significativo tanto da eliminação de ovos para o meio aquático ( $p = 0,001$ ) quanto na presença de ovos de *T. canis* no TGI dos peixes ( $p = 0,007$ ), ao longo do tempo (Tabela 2; Figura 1).

Em relação à migração, não houve recuperação de larvas nos tecidos avaliados. Algumas larvas foram encontradas na água do aquário e no TGI dos peixes. Esse achado foi atribuído ao processamento das amostras e análise do material, uma vez que existia a presença de casca de ovos próximo das larvas quando da análise microscópica. Todas as larvas apresentavam íntegras e com motilidade.

Não houve perda de peixes ou registro de alterações comportamentais nos grupos inoculados e controle durante o estudo. Nenhuma outra estrutura parasitária foi verificada na água, TGI ou tecidos dos peixes avaliadas.

## **Discussão**

O presente estudo avaliou o potencial de eliminação de ovos pelas fezes e a migração tecidual de larvas de *Toxocara canis* em peixes inoculadas experimentalmente. Os resultados indicam que os ovos embrionados foram eliminados para o ambiente aquático, permaneceram viáveis no intestino, e que as larvas não migraram pelos tecidos que foram avaliados dos peixes.

A recuperação de ovos na águas dos aquários confirmaram a proficiência de tilápias em eliminar de ovos de *Toxocara canis* para o meio ambiente, fenômeno observado em outros

estudos com hospedeiros paratênicos, como frangos (Meriguetti et al. 2018) e baratas (Sasmal et al. 2008; González-García et al. 2017) infectados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis*.

Aproximadamente 48,5% da dose utilizada de ovos na inoculação foi recuperada, com maior obtenção nas primeiras 48 horas, semelhante ao observado em baratas inoculadas com ovos de *T. canis* (González-García et al. 2017).

Os ovos de *Toxocara* spp., particularmente de *T. canis*, tendem a se aderir em diferentes materiais, especialmente em plástico (Kleine et al. 2016). No nosso estudo, as caixas utilizadas como aquários podem ter proporcionado a adesão de ovos e influenciado na recuperação, apesar da lavagem com água abundante durante o processo de filtragem. Não houve retenção de ovos nos tamises que poderiam influenciar na taxa de recuperação dessas estruturas parasitárias. Adotou-se a filtragem seriada em tamises metálicas com malhas de diferentes medidas, técnica utilizada para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em pelo de cães ou gatos (Anh et al. 2016; Meriguetti et al. 2017), e de amostras de solo (Ferreira et al. 2017; Choobineh et al. 2018).

A eliminação dos ovos recuperados foi observada após 16 horas de inoculação, com redução significativa até o fim das avaliações (10 dias). Verificou-se que a eliminação de ovos na água foi inversamente proporcional à presença de ovos no TGI, corroborando os achados observados em frangos (Meriguetti et al. 2018) e baratas (Sasmal et al. 2008). No nosso estudo, houve uma ampla variação (23% a 86%) no índice de recuperação de estruturas parasitárias por peixe, mostrando que não há um padrão de dispersão de ovos, como observado em frangos (Meriguetti et al. 2018).

Apesar da presença de ovos na água do aquário e no trato digestivo, não houve evidência de migração tecidual de larvas de *T. canis*. Esses resultados foram semelhantes aos

verificados em estudo experimental com baratas, que mostrou a presença de ovos e de larvas no TGI, mas sem registro de migração tecidual (Sasmal et al. 2008).

Sasmal et al. (2008) confirmaram a infecção de filhotes de cães com as fezes de baratas contendo ovos embrionados e larvas de *T. canis*. No presente estudo, embora algumas larvas tenham sido recuperadas no aquário e no TGI dos peixes infectados, esse fato foi atribuído ao rompimento dos ovos durante o processamento das amostras. Estas larvas apresentaram motilidade, fato pelo qual foram consideradas potencialmente infectante, excluindo a necessidade de realização de bioensaio.

Uma das possíveis causas para a ausência de migração deve-se ao fato de os peixes serem hospedeiros pecilotérmicos, não oferecendo condições ideais no TGI para eclosão das larvas de *T. canis* e migração das mesmas pelos tecidos, como ocorre em cães e gatos, classificados como hospedeiros definitivos, e outros animais homeotérmicos que podem servir como hospedeiros intermediários (Jacobs 1977; Strube et al. 2013).

Estudos têm mostrado a transmissão de toxocaríase humana pela ingestão de hospedeiros não vertebrados como caramujo (Caldera et al. 2013; Cardillo et al. 2016) e minhocas (Cianferoni et al. 2005), que podem servir como hospedeiros mecânicos e biológicos. Embora nenhuma larva tenha sido recuperada no tecido dos peixes avaliados no nosso estudo, o papel desses animais como hospedeiro de transporte na epidemiologia da toxocaríase deve ser ainda assim considerado.

Cães e gatos, infecatados com *T. canis*, podem viver nas proximidades de fazendas de produção de peixes e, neste caso, suas fezes podem contaminar a água de lagoas e tanques destinados à piscicultura (Lima dos Santos e Howgate 2011). Em Laos, foi verificado, por meio de georeferenciamento, que os cães possuem o hábito de entrar na água para se refrescar em dias quentes (Otake Sato et al. 2017), o que pode promover a contaminação de recursos

hídricos e manter o ciclo de vida dos parasitos que têm peixes e outros animais aquáticos como hospedeiros intermediários/paratênicos (Lima dos Santos e Howgate, 2011).

Diante da importância econômica e de saúde pública da comercialização e consumo de tilápias, o presente estudo enfatiza a participação desta disseminação de ovos embrionados de *T. canis* no ambiente aquático, o qual estas são criadas.

Dessa forma, a adoção de práticas adequadas de manejo com treinamentos regulares para os trabalhadores da cadeia produtiva e manipuladores de pescados podem minimizar os impactos das zoonoses transmitidas por peixes. Estas práticas devem incluir a restrição de acesso a animais de companhia e de produção, que podem contaminar os recursos hídricos (Awadallah, Salem 2015). Outra medida seria a adoção de cuidados na alimentação e tratamento anti-helmíntico dos animais de estimação e redução da contaminação ambiental por ovos de parasitos (Nissen et al., 2014).

## **Conclusão**

Tilápias foram proficientes na eliminação de ovos de *Toxocara canis* em ambiente aquático. Embora o consumo direto de tecidos de tilápia do Nilo não pareça representar um risco de transmissão de ovos de *T. canis*, os peixes infectados podem transmitir ovos desse nematódeo ao ambiente aquático.



## Referências

- Alexander N. (2012) Review: analysis of parasite and other skewed counts. *Trop Med Int Health* 17(6):684–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.02987.x>
- Anh NTL, Thuy DTT, Hoan DH, Hop NT, Dun DT (2016) Levels of *Toxocara* infections in dogs and cats from urban Vietnam together with associated risk factors for transmission. *Journal of Helminthology* 90(4), 508-510. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000619>
- Awadallah MAI, Salem LMA (2015) Zoonotic enteric parasites transmitted from dogs in Egypt with special concern to *Toxocara canis* infection. *Vet world* 8(8):946–957. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.946-957>
- Azizi S, Oryan A, Sadjjadi SM, Zibaeim M (2007) Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. *Parasitol Res* 102(1):47–52. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0722-5>
- Bao M, Pierce GJ, Pascual S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, Strachan NJ (2017) Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Sci Rep* 7:43699. <https://doi.org/10.1038/srep43699>
- Caldera F, Burlone ME, Genchi C, Pirisi M, Bartoli E (2013) *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection*. 41(3):691-694. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0342-6>
- Carbotta G, Laforgia R, Milella M, Sederino MG, Minafra M, Fortarezza F, Piscitelli D, Palasciano, (2016). Small bowel obstruction caused by *Anisakis* and Meckel's diverticulum: a rare case. *G Chir* 37(6):281–283
- Cardillo N, Prous CG, Krivokapich S, Pittaro M, Ercole M, Perez M, Pasqualetti M, Fariña F, Rosa A, Gatti G, Ribicich M (2016) First report of *Toxocara cati* in the domestic land snail *Rumina decollate*. *Rev Argent Microbiol* 48(3):206-209. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.004>
- Carvalho JSO, Ramos APS, Azevedo RV, Braga LGT (2016) Trânsito gastrointestinal de dieta seca para tilápia de 200 e 300 g. <http://www.uesc.br/laboratorios/aquanut/conbr.pdf>. Acessado em 12 de abril de 2019.
- Choobineh M, Mikaeili F, Sadjjadi S, Ebrahimi S, Iranmanesh S (2019) Molecular characterization of *Toxocara* spp. eggs isolated from public parks and playgrounds in Shiraz, Iran. *J Helminthol* 93(3):306-312. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000354>
- Cianferoni A, Schneider L, Schantz PM, Brown D, Fox LM (2006) Visceral larva migrans associated with earthworm ingestion: clinical evolution in an adolescent patient 117(2):e336-9. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1596>
- Cornaglia J, Jean M, Bertrand K, Aumaître H, Roy M, Nickel B (2017). Gnathostomiasis in Brazil: an emerging disease with a challenging diagnosis. *Journal of Travel Medicine* 24(1): taw074. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw074>

- El-Leithy AAA, Hemed SA, El Naby WSHA, El Nahas AF, Hassan SAH, Awad ST, El-Deeb SI, Helmy ZA (2019) Optimum salinity for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and mRNA transcripts of ion-regulation, inflammatory, stress- and immune-related genes. *Fish Physiol Biochem*. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00640-7>
- Ferreira A, Alho AM, Otero D, Gomes L, Nijse R, Overgaauw PAM, Carvalho LM. Urban Dog Parks as Sources of Canine Parasites: Contamination Rates and Pet Owner Behaviours in Lisbon, Portugal (2017) *Rev de Saúde Ambiental e Pública* 2017:5984086. <https://doi.org/10.1155 / 2017/5984086>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2019). Cultured Aquatic Species Information Programme: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Available at: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en) acessado em 03 mar 2019
- González-García T, Muñoz-Guzmán MA, Sánchez-Arroyo H, Prado-Ochoa MG, Cuéllar-Ordaz JA, Alba-Hurtado F (2017) Experimental transmission of *Toxocara canis* from *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* cockroaches to a paratenic host. *Vet Parasitol* 246:5-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.025>
- Jacobs DE, Pegg EF, Stevenson P (1977) Helminths of British dogs: *Toxocara canis*--a veterinary perspective. *J Small Anim Pract* 18(2):79-92
- Kleine A, Janecek E, Waindok P, Strube C (2016) Flotation and adherence characteristics of *Toxocara canis* and *T. cati* and a reliable method for recovering *Toxocara* eggs from soil. *Vet Parasitol* 227:35-41. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.023>
- Kyei G, Ayi I, Boampong JN, Turkson PK. (2015) Sero-epidemiology of *Toxocara canis* infection in children attending four selected health facilities in the Central Region of Ghana. *Gana Med J* 49(2):77-83
- Krücken J, Blümke J, Maaz D, Demeler J, Ramünke S, Antolová D, Schaper R, von Samson-Himmelstjerna G (2017) Small rodents as paratenic or intermediate hosts of carnivore parasites in Berlin, *PLoS One* 12(3):1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172829>.
- Liboschik T, Fried R, Fokianos K, Probst P (2017) tscount: Analysis of Count Time Series. R package version 1.4.1. <https://CRAN.R-project.org/package=tscount>
- Lima dos Santos CAM, Howgate P (2011) Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture* 318(3-4):253-261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.046>
- Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, Hotez PJ, Gasser RB (2018) Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis* 18(1):14–24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
- Macpherson CNL (2005) Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* (11-12):1319–1331. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.004>

- MagnaVal JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B (2001) Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 39(1):1–11. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>
- Mehrdana F, Buchmann K, (2017) Excretory/secretory products of anisakid nematodes: biological and pathological roles. *Acta Vet Scand* 59(1): 59-42. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0310-3>.
- Melo RMC, Ribeiroa YM, Luz RK, Bazzolic N, Rizzoa E (2016) Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Anim Reprod Sci* 172:148-156. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.07.013>
- Merigueti YFFB, Santarém VA, Ramires LM, da Silveira Batista A, da Costa Beserra LV, Nuci AL, de Paula Esposte TM (2017) Protective and risk factors associated with the presence of *Toxocara* spp. eggs in dog hair. *Vet Parasitol* 244:39-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020>.
- Merigueti YFFB, Raposo RS, Zampieri BP, Cerazo LML, Pereira L, Santarém VA (2018) Dispersion and infectivity of *Toxocara canis* eggs after passage through chicken intestine. *Parasitol Res* 117(11):3481-3486. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6045-x>
- Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H. (2006) A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am J Trop Med Hyg* 75(2):303-6.
- Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J*. 50(4):343-360.
- Nissen S, Nguyen LA, Thamsborg SM, Dalsgaard A, Johansen MV (2014) Reinfection of dogs with fish-borne zoonotic trematodes in northern Vietnam following a single treatment with praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1):e2625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002625>
- Noh Y, Hong ST, Yun JY, Park HK, Oh JH, Kim YE, Jeon BS (2012) Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *J Korean Med Sci* 27(9):1105–1108. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.9.1105>
- Otake Sato M, Sato M, Yoonuan T, Pongvongsa T, Sanguankiat S, Kounnavong S, Maipanich W, Chigusa Y, Moji K, Waikagul J (2017) The role of domestic dogs in the transmission of zoonotic helminthes in a rural area of Mekong river basin, *Acta Parasitol* 62(2):393–400. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0047>.
- Pecinali NR, Gomes RN, Amendoeira FC, Bastos AC, Martins MJ, Pegado CS, Bastos OM, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC (2005) Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet Parasitol* 134(1-2):121-130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.022>

- Pedrazzani AS, Molento CFM, Carneiro PCF, Fernandes-de-Castilho M (2007) Senciência e bem-estar de peixes: uma visão de futuro do mercado consumidor. *Pan Aquic* 102:24-29
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Salem G, Schantz P (1992) Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin Infect Dis* (15):743-744. <https://doi.org/10.1093/clind/15.4.743>
- Sanders JL, Zhou Y, Moulton HM, Moulton ZX, McLeod R, Dubey JP, Kent ML (2015) The zebrafish, *Danio rerio*, as a model for *Toxoplasma gondii*: an initial description of infection in fish. *J Fish Di* 38(7):675–679. <https://doi.org/10.1111/jfd.12393>
- Santos SV, Santos FHY, Lescano SAZ, Santos DM, Tiago ÉS, Fonseca GR, Ribeiro MCSA, Chieffi PP. (2017) Migration pattern of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected male and female *Rattus norvegicus*. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(5):698-700. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0076-2017>
- Sasmal NK, Pahari TK, Laha R (2008) Experimental infection of the cockroach *Periplaneta americana* with *Toxocara canis* and the establishment of patent infections in pups. *J Helminthol* 82(2):97-100. <https://doi.org/10.1017/S0022149X07875936>
- Stürchler D, Weiss N, Gassman M (1990) Transmission of toxocariasis. *J Infect Dis* 162(2):571
- Strube C, Heuer L, Janecek E (2013) *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 193(4): 375-389. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>
- Taira K, Permin A, Kapel CMO (2003) Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol Res* 90(6):521-523. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0894-6>
- Thu ND, Dalsgaard A, Loan LT, Murrell KD (2007) Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *Korean J. Parasitol* 45(1): 45-54. <https://doi.org/10.3347/kjp.2007.45.1.45>
- Tran TK, Murrell KD, Madsen H, Nguyen VK, Dalsgaard A (2009) Fishborne zoonotic trematodes in raw fish dishes served in restaurants in Nam Dinh Province and Hanoi, Vietnam. *J Food Prot.* 72(11):2394-2399.
- Wilson K, Grenfell BT (1997) Generalized linear modelling for parasitologists. *Parasitol Today* 13(1):33-38. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(96\)40009-6](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)40009-6)
- Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, O uji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyama H, Akao N (2008) A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver, *Parasitol Int* 57(4):525-529. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.08.002>

Zhang M, Yang Z, Wang S, Tao L, Xu L, Yan R, Song X, Li X (2014) Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Vet Parasitol* 200(1-2):85-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.022>

**Tabela 1** - Momentos de avaliação da liberação de ovos em meio aquático (\*) e migração de larvas em tecidos (+) após inoculação experimental de Tilápia do Nilo (GI n=15) com 300 ovos embrionados de *Toxocara canis*. Um peixe não infectado foi avaliado em cada momento, constituindo o Grupo controle (GC n=5).

Grupos (peixes avaliados)	Momentos de Avaliação (horas)				
	16	24	48	72	240
GI (3)	*+	NA	NA	NA	NA
GI (3)	NA	*+	NA	NA	NA
GI (3)	NA	*	*+	NA	NA
GI (3)	NA	*	*	*+	NA
GI (3)	NA	*	*	*	*+
GC (5)	*+	*+	*+	*+	*+

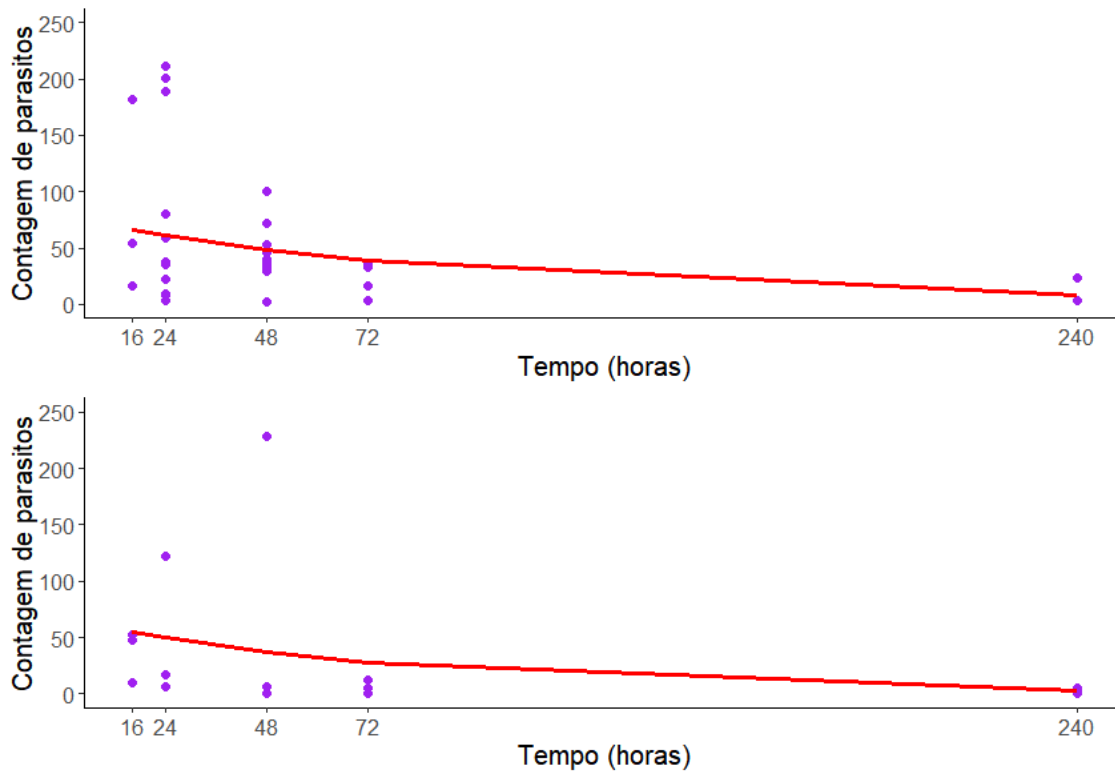
NA: Não Avaliados.

**Tabela 2** – Modelo de regressão binomial negativa para estimativa da eliminação de ovos de *Toxocara canis* no meio aquático e no TGI de tilápias do Nilo (n= 15) inoculados experimentalmente, em função do tempo.

<b>Ovos no Aquário</b>					
Parâmetros	Estimativa	Erro padrão	Estatística Z	p	AIC
Intercepto	4.342	0,244	17,74	< 0,001	
Tempo (horas)	-0,010	0,003	-3,17	0,001	322,9
<b>Ovos no TGI dos peixes</b>					
Parâmetros	Estimativa	Erro padrão	Estatística Z	p	AIC
Intercepto	4.161	0,478	8,676	< 0,001	
Tempo (horas)	-0,013	0,005	-2,697	0,007	194,76

p = significância estatística dos coeficientes de regressão associada à estatística Z; AIC = critério de informação de Akaike.

**Figura 1** – Curva de regressão no modelo binomial negativo para representação da eliminação de ovos de *Toxocara canis* no meio aquático (superior) e no TGI (inferior) de tilápias do Nilo (n= 15) infectadas experimentalmente, ao longo do tempo.





## **ANEXO 1- NORMAS DA REVISTA PARASITOLOGY RESEARCH**

### TYPES OF PAPERS

All manuscripts should be clear, straightforward and concise.

#### Original Papers

Original Papers should report data from original research and have no strict limitations in length; however, they should not exceed 10 printed pages (one printed page corresponds to approximately 850 words of text, or 3 illustrations with their legends).

#### Reviews

Reviews should be comprehensive, fully referenced expositions of subjects of general interest, including background information and detailed critical analyses of current work in the field and its significance. Review articles have no limitation in length. The editors reserve the right to ask for abbreviation of the text if too excessive.

#### Short Communications

Short Communications should deal with a single point. They should not exceed 3 printed pages (one printed page corresponds to approximately 850 words of text, or 3 illustrations with their legends). “Results” and “Discussions” should be combined. Up to 20 references are recommended. The editors reserve the right to decide what constitutes a Short Communication.

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

#### Submission of revisions

Please submit your revised manuscript as a marked-up text (Word) file in which all changes can be tracked. Additionally, please upload a line-by-line response to all reviewers’ remarks when you submit the revised manuscript.

#### Costs of Colour Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

### TITLE PAGE

#### Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Important note:

Authors are requested to use automatic continuous line numbering throughout the manuscript and in double space.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature

The International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) must be observed. Genus and species names should be in italics. Authors of scientific names of the genus and species group should not be italicized. At first mention, a specific name should be cited with nomenclatural author and year, e.g. *Catenula lemnae* (in italics) Dugès, 1832. When three or more joint

authors have been responsible for a name, then the citation of the name of the authors may be expressed by use of the term "et al." following the name of the first author, provided that all authors of the name are cited in full elsewhere in the same work, either in the text or in a bibliographic reference. Authors unfamiliar with the taxonomy of the group to which a species belongs should consult an expert to ensure that it is properly identified and that the correct name is used.

## REFERENCES

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

### Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

### Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

### ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

## TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art

#### Line BW

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

#### Halftone gray color

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art

#### Combined

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This

feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

#### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing'). Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked “retracted” and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author’s institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author’s and article’s bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.



The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

#### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

##### 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid

down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the name of the ethics committee that granted the exemption and the reasons for the exemption).

Authors must - in all situations as described above - include the name of the ethics committee and the reference number where appropriate.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee (include name of committee + reference number) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

Ethical approval retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). Please provide the name of ethics committee and relevant permit number.

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.(include name of committee + permit number)"

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

"This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

## INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity

numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”