



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

**Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de
antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de
captura em amostras fecais de bovinos**

Araçatuba

2020

DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Prof. Dr. Alex Akira Nakamura
Coorientadora: Dra. Sarita Priscila Gobbo Ferrari

Araçatuba

2020

S586p

Silva, Débora Regina Romualdo da

Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos / Débora Regina Romualdo da Silva. -- Araçatuba, 2020

65 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Alex Akira Nakamura

Coorientadora: Sarita Priscila Gobbo Ferrari

1. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 2. Criptosporidiose. 3. Bovinos. 4. Zoonoses. 5. Diagnóstico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos

AUTORA: DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

ORIENTADOR: ALEX AKIRA NAKAMURA

COORDINADORA: SARITA PRISCILA GOBBO FERRARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA (Participação Virtual) 
Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN (Participação Virtual)
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 16 de dezembro de 2020.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos

AUTORA: DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

ORIENTADOR: ALEX AKIRA NAKAMURA

COORIENTADORA: SARITA PRISCILA GOBBO FERRARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA (Participação Virtual)

Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Alex Akira Nakamura, is placed above the name of the virtual participant.

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN (Participação Virtual)

Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 16 de dezembro de 2020.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos

AUTORA: DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

ORIENTADOR: ALEX AKIRA NAKAMURA

COORIENTADORA: SARITA PRISCILA GOBBO FERRARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA (Participação Virtual)

Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN (Participação Virtual)

Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Silvana", is placed next to the name of the third examiner.

Araçatuba, 16 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por cada dificuldade que passei e me mantive forte, por aprender com os dias ruins e pelos dias bons.

Aos meus familiares, por acreditarem em mim e nos meus sonhos. Aos amigos pelos momentos alegres e pelo apoio nos momentos difíceis. E ao meu namorado Giovanni Brandão Elias, por todo carinho e motivação, obrigada por ser meu confidente.

A todos os professores dos quais tive a honra de ser aluna e contribuíram para que eu chegasse até aqui, deixando um pedacinho de si e levando um pedacinho de mim.

Ao Prof. Dr. Alex Akira Nakamura, pela orientação do trabalho, pela paciência, incentivo, acolhimento e amizade, obrigada por ter me dado uma chance! A Dr. Sarita Priscila Gobbo Ferrari, pela coorientação e por todo suporte diante às adversidades encontradas pelo caminho.

Aos professores da Pós Graduação, por contribuírem diariamente com o meu aprendizado e crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, que ajudou disponibilizando seu espaço para a realização do trabalho além de contribuir com insumos.

As amizades construídas ao longo de toda Pós graduação que levarei para vida toda, (em especial a Jussara Satori Nakamura que me apoiou desde o começo, pela gentileza e por ajudar a transformar minha trajetória mais leve e humorada).

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na realização e conclusão deste trabalho, principalmente o Dr. Walter Bertequini Nagata, obrigada por todo auxílio prestado no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal – DAPSA e a Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA /UNESP, pela oportunidade, estrutura e suporte para realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

“Seja como a água que abre caminho através das pedras: não se
oponha ao obstáculo; contorne-o!”

Bruce Lee

SILVA, D.R.R. **Produção e avaliação de anticorpos IgY para detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais de bovinos.** 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Cryptosporidium spp. são protozoários coccídeos que infectam uma grande variedade de vertebrados. Sua transmissão ocorre de forma fecal-oral e frequentemente devido a ingestão de água e alimentos contaminados ou por contato indireto ou direto com fezes de hospedeiros infectados. O objetivo neste estudo foi avaliar a utilização dos anticorpos IgY policlonais em um ELISA de captura para detecção de antígenos solúveis de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bovinos, comparativamente à análise microscópica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (padrão-ouro). Um total de 214 amostras foram colhidas e submetidas as análises. Do total de 214 amostras, 17,29% (37/214) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela microscopia. Pelo ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática) de captura foi possível detectar 20,09% (43/214) de amostras reagentes para antígenos fecais de *Cryptosporidium parvum*. Pelo teste Kappa, foi observado uma excelente concordância (0.9079). Por meio do teste de McNemar houve diferença significativa entre a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas usadas ($p < 0,05$). Uma vez que o requisito principal avaliado foi a sensibilidade do teste, os melhores resultados foram obtidos adicionando a curva ROC, com ponto de corte em 0.4315, onde foram observados sensibilidade de 100% e especificidade de 95,6%. Assim, o uso do anticorpo monoclonal anti-peptídeo da proteína GP15 em conjunto com o anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos no ELISA de captura permitiu a determinação de amostras positivas para *C. parvum*.

Palavras-chave: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. Criptosporidiose. Bovinos. Zoonoses. Diagnóstico.

SILVA, D.R.R. **Prodution and evaluation of IgY antibodies for *Cryptosporidium parvum* antigens detection using sandwich ELISA in cattle fecal samples.** 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. are coccid protozoa that infect a wide variety of vertebrates. The transmission occurs in fecal-oral form and often due to the ingestion of contaminated water and food or by indirect or direct contact with feces from infected hosts. The objective of this study was to evaluate the use of polyclonal IgY in a sandwich ELISA for the detection of soluble *Cryptosporidium parvum* antigens in bovine fecal samples, compared to the microscopic analysis for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts (gold standard). A total of 214 samples were collected and submitted to analysis. The results from microscopic analysis revealed that 17.29% (37/214) were positive for *Cryptosporidium* spp.. The sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) detected 20.09% (43/214) of positivity for *Cryptosporidium parvum* fecal antigens. The Kappa test showed an excellent agreement (0.9079). Through the McNemar test, there was a significant difference in the proportion of positive results between the two techniques ($p < 0.05$). Since the main requirement was the sensitivity of the test, the best results were observed by adding the ROC curve with a cut-off point of 0.4315, where 100% of sensitivity and 95.6% of specificity were observed. Thus, the use monoclonal antibody anti-GP15 protein peptide in conjunction with polyclonal IgY anti-oocyst antibody in sandwich ELISA allowed the determination of *C. parvum* positive samples.

Keywords: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cryptosporidiosis. Cattle. Zoonosis. Diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de reprodução do *Cryptosporidium parvum* após a excitação no trato gastrointestinal. 13
Fonte: traduzida de BOUZID et al., 2013.
- Figura 2 - Gel SDS-PAGE 16% das frações colhidas após purificação de IgY policlonal. 25
- Figura 3 - Curva ROC das médias de 214 amostras positivas e negativas no teste de ELISA, sensibilidade e especificidade variando de 0 a 100%. 27
- Figura 4 - Boxplot de grupos de animais paciente (positivos) e controle (negativos) e suas respectivas DO 450nm, nos testes ELISA e microscopia. 27
- Figura 5 - A: Bezerro infectado com *C. parvum*; B: setas: oocistos de *C. parvum* presentes na amostra fecal do bezerro da Figura 3A; coloração negativa de verde malaquita, objetiva de 40X. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ponto de corte e melhores resultados da curva ROC para ELISA de captura contra glicoproteína GP15, com 100% de sensibilidade	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
WHO	World Health Organization
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
kDa	Kilodalton
DNA	deoxyribonucleic acid
IgY	Imunoglobulina Y
IgG	Imunoglobulina G
RID	Reação de Imunofluorescência Direta
CEUA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
UNESP	Universidade Estadual Paulista
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline com Tween
pH	Potencial hidrogeniônico
μl	Microlitros
TMB	Tetramethylbenzidine
M	Molar
nm	Nanomolar
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
ng	Nanograma
RFLP	Fragmento amplificado por enzimas de restrição
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DO	Densidade ótica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Diagnóstico	14
1.2 Patogenicidade e Virulência.....	15
1.3 Prevenção e Tratamento.....	17
1.4 Objetivo	17
2 CAPÍTULO 1- PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS IgY PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> UTILIZANDO ELISA DE CAPTURA EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS	18
2.1 Resumo.....	19
2.2 Abstract.....	20
2.3 Introdução	21
2.4 Material e métodos.....	22
2.4.1 Comitê de Ética.....	22
2.4.2 Amostras de fezes	22
2.4.3 Purificação do anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos.....	23
2.4.4 ELISA de captura	24
2.4.5 Análise estatística	24
2.5 Resultados	25
2.6 Discussão	28
2.7 Conclusão	31
2.8 Agradecimentos	31
2.9 Referências.....	31
APÊNDICE A. Média dos resultados do ELISA usados na curva ROC. Padrão ouro: microscopia.....	37
APÊNDICE B. Referências da Introdução Geral.....	42
ANEXO 1 - Ofício de aprovação do comitê de ética em pesquisa	47
ANEXO 2 - Normas de Publicação da Revista	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cryptosporidium spp. é um importante enteropatógeno de hospedeiros imunocompetentes e imunodeprimidos. Para indivíduos com a imunidade enfraquecida, como crianças pequenas, pessoas gravemente desnutridas ou com enfermidades que causam imunodeficiência de células T (como a infecção por HIV não tratada), os sintomas podem ser graves e durar muito tempo, podendo ser fatal (CHECKLEY et al., 2015). Em indivíduos imunossuprimidos, a infecção é geralmente crônica, podendo levar a óbito (RYAN et al., 2016).

Cryptosporidium spp. é um parasito pertencente ao Filo Apicomplexa que infecta o epitélio do trato gastrointestinal de uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (RYAN et al., 2018). A criptosporidiose humana pode ser uma antroponose ocasionada por *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* ou uma antrozoonose, com envolvimento principalmente do *C. parvum* (RAMIREZ et al., 2004). A criptosporidiose é classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma enfermidade causada por um patógeno referência associado à qualidade da água (WHO, 2006).

Cryptosporidium spp. pode causar diarreia, mas a falta de apetite, febre ou má absorção são sinais clínicos que também podem ser observados. As infecções ocasionadas por esse protozoário causam grandes problemas de saúde para os animais, especialmente entre os recém-nascidos, levando a perdas econômicas relacionadas ao declínio do crescimento e mortalidade de animais infectados. Além disso, a criptosporidiose aumenta o custo da saúde animal e dos serviços veterinários (SANTIN, 2013). Muitas espécies de *Cryptosporidium* spp. são importantes para a saúde pública e veterinária, mas ainda há uma falta de ferramentas de subtipagem e determinantes genéticos específicos do hospedeiro. A diarreia é causada por mecanismos que envolvem aumento da permeabilidade intestinal, secreção de cloreto e má absorção (CHECKLEY et al., 2015).

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. é bastante complexo, envolvendo reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (merogonia) em um único hospedeiro (THOMPSON, 2008). O *Cryptosporidium* spp. é transmitido por via fecal-oral tanto

diretamente por meio do contato de fezes do hospedeiro infectado, bem como indiretamente por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (XIAO, 2010; FENG, 2011).

Após o hospedeiro ingerir os oocistos esporulados, há excitação no trato gastrointestinal e quatro esporozoítos são liberados para penetração na célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo. Apesar desses parasitos serem intracelulares, eles são extracitoplasmáticos e, portanto, não entram em contato com o citoplasma da célula hospedeira. Após a formação do vacúolo, ocorre a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos, iniciando um processo de reprodução assexuada (SMITH et al., 2007).

Na reprodução assexuada, os trofozoítos passam por merogonia dando origem a merontes do tipo I, contendo oito merozoítos em seu interior (SMITH et al., 2007). Merozoítos tipo I são liberados e podem infectar novas células na parede intestinal (autoinfecção), repetindo as etapas da reprodução assexuada, originando novamente os trofozoítos ou então resultando em merontes tipo II que liberarão os merozoítos do tipo II que, liberando suas formas invasivas, irão se desenvolver em merontes tipo III, e assim possibilitar a formação dos estágios sexuais do parasito (CURRENT; UPTON; HAYNES, 1986).

Merozoítos do tipo II ou III se diferenciam em estágios sexuais, representados por microgametócitos e macrogametócitos, que formam, respectivamente, microgametas e macrogametas (SMITH et al., 2007). Um microgametócito fecunda um macrogametócito gerando o zigoto. Este sofrerá meiose gerando 4 esporozoítos, posteriormente, diferenciação em dois tipos de oocistos: os de parede fina (20%) e os de parede espessa (80%). Ambos possuem capacidade de esporulação dentro do hospedeiro, contendo em seu interior quatro esporozoítos livres. Oocistos de parede fina sofrem excitação na luz do trato gastrointestinal ou do trato respiratório, onde são capazes de iniciar uma autoinfecção no hospedeiro, enquanto que os oocistos de parede espessa são eliminados em fezes, na forma infectante (SMITH et al., 2007; XIAO; THOMPSON, 2008) (Fig. 1). Oocistos são ambientalmente estáveis e podem sobreviver por meses em condições ambientais com elevado teor de umidade e frios intensos, além de serem resistentes aos níveis de cloro comumente usados no tratamento de água

(HEMPHILL et al., 2019).

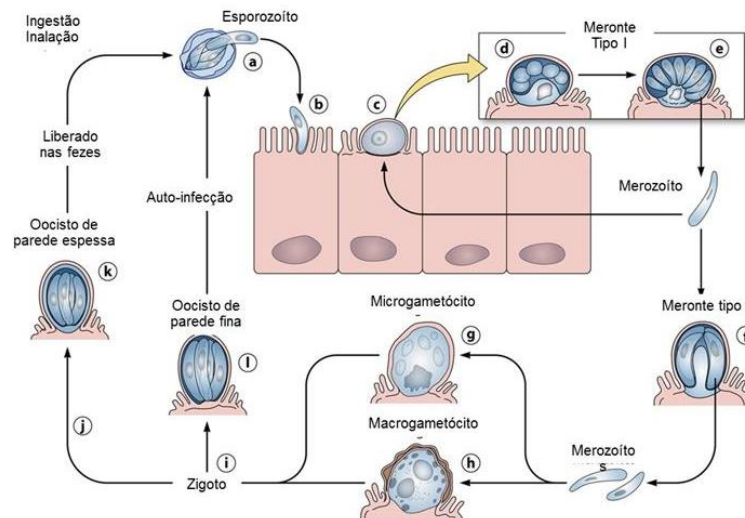


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de reprodução do *Cryptosporidium parvum* após a excitação no trato gastrointestinal. Fonte: traduzida de BOUZID et al., 2013.

Atualmente, 38 espécies válidas de *Cryptosporidium* spp. foram reconhecidas em peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (FENG; RYAN; XIAO, 2018), e mais de 40 genótipos de *Cryptosporidium* spp. (uma vez que não há informações suficientes para classificação desses genótipos em novas espécies), dentre as quais 19 podem infectar humanos (ROBINSON; ELWIN; CHALMERS, 2019). O *C. parvum* é descrito como a principal espécie patogênica em ruminantes pré-desmamados (FENG; RYAN; XIAO, 2018).

C. parvum é um parasito muito relevante em Saúde Pública, e embora essa seja a espécie predominante em casos de infecções em bovinos e no homem, ainda não está totalmente esclarecida a relevância da participação dos bovinos na cadeia epidemiológica da criptosporidiose humana (XIAO; FENG, 2008). A quantidade de oocistos presentes nas fezes representa um risco significativo de contaminação do meio ambiente e de transmissão para os seres humanos (BROOK et al., 2009). O número de oocistos eliminados pelo hospedeiro infectado, a resistência dos oocistos no ambiente e a baixa dose para causar infecção são fatores que tornam o *Cryptosporidium* spp. um patógeno altamente infectante (RYAN et al., 2016; VANATHY et al., 2017).

1.1 Diagnóstico

Uma opção para o diagnóstico de criptosporidiose poderia ser o ensaio imunoenzimático de captura (ELISA), que possui diversas vantagens, como alta sensibilidade, especificidade e praticabilidade (JEX et al., 2008), visto que frequentemente o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. depende da detecção de oocistos ou antígenos em amostras de fezes de humanos ou animais infectados. As técnicas convencionais incluem o uso de esfregaços de fezes, coloração ácido-resistente modificada e exame microscópico para detectar oocistos. Embora seja um método barato, tem baixa sensibilidade e especificidade e requer conhecimento técnico. (CHALMERS et al., 2011).

Além de alta sensibilidade e especificidade, os métodos de detecção molecular baseados na PCR fornecem vantagens para a amplificação de sequência de genes específicos para espécies, auxiliando dessa forma na genotipagem, na quantificação e diferenciação de várias espécies de *Cryptosporidium* spp. (HADFIELD et al., 2011; ICHIKAWA-SEKI et al., 2015). Porém, o uso dessas técnicas é limitado, pois requer a utilização de equipamentos especializados, além de reagentes caros (FEREIG et al., 2018).

Apesar da utilização de vários marcadores genéticos para a identificação específica de *Cryptosporidium* spp., o locus geralmente mais usado em estudos epidemiológicos moleculares é o gene que codifica a glicoproteína GP60. Sendo este gene muito importante na epidemiologia molecular, porque contém várias regiões com altas taxas de mutação (MIURA et al., 2017), além disso é uma candidata com grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, métodos de diagnóstico e tratamento da criptosporidiose (PREIDIS et al., 2007). A clivagem da proteína GP60 dá origem as glicoproteínas GP15 e GP40, e é altamente polimórfico, usado como um marcador discriminatório para detectar subtipos de *C. parvum* humano, animal e/ou zoonótico na sequência de DNA (FENG; RYAN; XIAO, 2018).

Em virtude da importância de *Cryptosporidium* spp. para a Saúde Única, referente aos testes imunológicos faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico desse parasito nos humanos, animais, amostras ambientais e de água destinadas ao consumo, visto que as técnicas utilizadas até o momento estão

sujeitas a limitações, como baixa sensibilidade e especificidade, além do alto custo (FRANCO et al., 2012).

Assim, uma técnica pouco utilizada em testes de diagnóstico imunológico é a aplicação de imunoglobulinas purificadas de ovos de galinhas imunizadas (classe IgY), em substituição das imunoglobulinas de mamíferos (IgG), com várias vantagens, como a alta produção e rendimento, processo simples de purificação das imunoglobulinas, reduzido número de animais imunizados, alta afinidade e especificidade, praticidade na colheita, a não necessidade de sangria ou eutanásia dos animais, o baixo custo e facilidade de manejo (MICHAEL et al., 2010).

A utilização de anticorpos IgY possibilita que não ocorram resultados falso-positivos, comumente possíveis de serem encontrados em testes imunológicos que utilizam amostras celular ou sorológica de mamíferos, uma vez que não interagem com receptores Fc de mamíferos, impedindo a fixação do complemento e a influência do fator reumatoide (ZHANG, 2003). Do ponto de vista filogenético, as classes das aves e mamíferos são bem distantes, dessa forma se permite a produção de imunoglobulinas altamente conservadas de mamíferos (LARSSON et al., 1998), podendo reconhecer epítomos diferentes dos de mamíferos, aumentando assim a diversidade de anticorpos produzidos (FERREIRA JUNIOR et al., 2012).

1.2 Patogenicidade e Virulência

A virulência dos patógenos entéricos vem de sua própria base genética, da capacidade do sistema imunológico do hospedeiro e de seu estado nutricional, como a disponibilidade de ferro e a interação com outros microrganismos intestinais (BURET et al., 2019).

Estudos em sistemas de cocultura auxiliam na identificação de fatores de patogenicidade e virulência (KARANIS; ALDEYARBI, 2011). A patogenicidade de *Cryptosporidium* spp. varia conforme a espécie hospedeira, idade e estado imunológico do mesmo (FENG; RYAN; XIAO, 2018).

Com base em estudos com esses sistemas, fatores mediando excitação, invasão, formação de vacúolo parasitóforo, manutenção intracelular e dano à célula hospedeira podem ser identificados como importantes fatores de virulência (BOUZID et

al., 2013).

A ligação e a invasão das células hospedeiras são mediadas por proteínas (como a lectina de galactose / N-galactosamina específica) (HOWE et al., 2005) e a proteína SAG1 (CARDOSO et al., 2016) liberado de um conjunto de organelas secretoras, que fazem parte do complexo apical. A infecção requer extensa remodelação do citoesqueleto, e os esporozoítos invasores são finalmente localizados no vacúolo do parasito, circundados pela membrana do seu vacúolo, que é basicamente a membrana derivada da superfície da célula hospedeira e é modificada após a invasão. Uma vez dentro da célula, esses parasitos permanecem no domínio apical da célula hospedeira, portanto, o vacúolo do parasito é um compartimento intracelular, porém extracitoplasmático (HEMPHILL et al., 2019).

Assim, a membrana vacuolar do parasito protege-o das defesas do hospedeiro. Trofozoítos se formam e eventualmente se desenvolvem em merozoítos, e desenvolvem sexualmente esporozoítos e oocistos, que são infectantes por via oral. O dano ao tecido ocorre por meio da ruptura da junção estreita do epitélio, o que leva a alterações no citoesqueleto, perda da função de barreira e, por fim, aumento da morte celular. Alterações essas causadas por enzimas líticas, como fosfolipase e protease (HEMPHILL et al., 2019).

No local da infecção são liberadas citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (MCDONALD et al., 2013), interleucinas (DRINKALL et al., 2017) e quimiocinas. A resposta inflamatória resultante leva ao aumento da permeabilidade epitelial, diminuição da absorção intestinal e aumento da secreção, aumentando assim sintomas como má absorção e diarreia. Por outro lado, estimulam mecanismos de defesa inatos, como a liberação de peptídeos antimicrobianos e respostas imunes adaptativas, levando ao controle da infecção de hospedeiros imunocompetentes (HEMPHILL et al., 2019).

Além de ser um marcador molecular proeminente, o gene que codifica a proteína GP60 também é de importância funcional porque está envolvida na adesão de parasitos às células do hospedeiro (O'CONNOR et al., 2007). Após a ingestão dos oocistos, a fixação ao epitélio ocorre com auxílio das glicoproteínas GP900, GP60 e da proteína ligante circunsporozoíto (VANATHY et al., 2017).

1.3 Prevenção e Tratamento

A prevenção é o tratamento da água por filtração (AL-SABI et al., 2015) ou desinfecção por radiação (SOLIMAN et al., 2018). Além disso, a atenção padrão à higiene (ou seja, lavar as mãos) pode ser usada para evitar a transmissão de pessoa para pessoa e de animal para humano. O tratamento de indivíduos sintomáticos pode prevenir a autoinfecção e evitar a infecção para pessoas saudáveis (LA HOZ et al., 2019).

Para alguns pacientes infectados pelo HIV, a paromomicina, um aminoglicosídeo oral não absorvido de *Streptomyces* ou paromomicina em combinação com azitromicina pode ser parcialmente benéfico (MASUR et al., 2014). Nitazoxanida e outros não-nitroimidazóis são eficazes contra criptosporidiose em modelos de roedores (GARGALA et al., 2013), porém ainda não está evidente se esses compostos agem no parasito ou no hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013). Em alguns estudos, o tratamento com nitazoxanida pode reduzir significativamente a duração da diarreia em crianças desnutridas e reduzir o risco de morte, e os ensaios clínicos demonstraram que esta terapia é eficaz para adultos. No entanto, outros pesquisadores mostraram falhas no tratamento com nitazoxanida em pacientes com funções imunológicas imunossuprimidas (HEMPHILL et al., 2019).

1.4 Objetivo

Partindo desse pressuposto, nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar a utilização dos anticorpos IgY policlonais em um ELISA de captura para detecção de antígenos solúveis de *C. parvum* em amostras fecais de bovinos, comparativamente à análise microscópica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (padrão-ouro).

2 CAPÍTULO 1- PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS IgY PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Cryptosporidium parvum* UTILIZANDO ELISA DE CAPTURA EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS

Débora Regina Romualdo da Silva¹; Sarita Priscila Gobbo Ferrari¹; Walter Bertequini Nagata¹; Marcelo Vasconcelos Meireles²; Alex Akira Nakamura^{1,*},

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

²Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

***Autor correspondente**

Endereço postal completo: Rua Clóvis Pestana, 793 - Dona Amélia – Araçatuba, São Paulo - CEP 16050-680.

Telefone: +55 (18) 3636-1351

E-mail: alex.nakamura@unesp.br

2.1 Resumo

Cryptosporidium spp. são protozoários coccídeos que infectam uma grande variedade de vertebrados. Sua transmissão ocorre de forma fecal-oral e frequentemente devido a ingestão de água e alimentos contaminados ou por contato indireto ou direto com fezes de hospedeiros infectados. O objetivo neste estudo foi avaliar a utilização dos anticorpos IgY policlonais em um ELISA de captura para detecção de antígenos solúveis de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bovinos, comparativamente à análise microscópica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* (padrão-ouro). Um total de 214 amostras foram colhidas e submetidas as análises. Do total de 214 amostras, 17,29% (37/214) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela microscopia. Pelo ELISA de captura foi possível detectar 20,09% (43/214) de amostras reagentes para antígenos fecais de *Cryptosporidium* spp.. Pelo teste Kappa, foi observado uma excelente concordância (0.9079). Por meio do teste de McNemar houve diferença significativa entre a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas usadas ($p < 0,05$). Uma vez que o requisito principal avaliado foi a sensibilidade do teste, os melhores resultados foram obtidos adicionando a curva ROC, com ponto de corte em 0.4315, onde foram observados sensibilidade de 100% e especificidade de 95,6%. Assim, o uso do anticorpo monoclonal anti-peptídeo da proteína GP15 em conjunto com o anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos no ELISA de captura permitiu a determinação de amostras positivas para *C. parvum*.

Palavras-chave: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. Criptosporidiose. Bovinos. Zoonoses. Diagnóstico.

2.2 Abstract

Cryptosporidium spp. are coccid protozoa that infect a wide variety of vertebrates. The transmission occurs in fecal-oral form and often due to the ingestion of contaminated water and food or by indirect or direct contact with feces from infected hosts. The objective of this study was to evaluate the use of polyclonal IgY in a sandwich ELISA for the detection of soluble *Cryptosporidium parvum* antigens in bovine fecal samples, compared to the microscopic analysis for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts (gold standard). A total of 214 samples were collected and submitted to analysis. The results from microscopic analysis revealed that 17.29% (37/214) were positive for *Cryptosporidium* spp.. The sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) detected 20.09% (43/214) of positivity for *Cryptosporidium parvum* fecal antigens. The Kappa test showed an excellent agreement (0.9079). Through the McNemar test, there was a significant difference in the proportion of positive results between the two techniques ($p < 0.05$). Since the main requirement was the sensitivity of the test, the best results were observed by adding the ROC curve with a cut-off point of 0.4315, where 100% of sensitivity and 95.6% of specificity were observed. Thus, the use monoclonal antibody anti-GP15 protein peptide in conjunction with polyclonal IgY anti-oocyst antibody in sandwich ELISA allowed the determination of *C. parvum* positive samples.

Keywords: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cryptosporidiosis. Cattle. Zoonosis. Diagnostic.

2.3 Introdução¹

Cryptosporidium spp. são protozoários coccídeos pertencentes ao Filo Apicomplexa que infectam uma grande variedade de vertebrados, incluindo seres humanos (Santín, 2012; Checkley et al., 2015; Thompson; Ash, 2016; Hemphill et al., 2019). Sua transmissão é fecal-oral e ocorre frequentemente pela ingestão de água e alimentos contaminados ou por contato indireto ou direto com fezes de hospedeiros infectados (Cacciò; Chalmers, 2016; Dumaine; Tandel; Striepen, 2019).

A classificação taxonômica ou a posição sistemática de *Cryptosporidium* spp. está em permanente atualização com o auxílio de métodos moleculares e filogenéticos (Wegayehu et al., 2016; Xiao; Feng, 2017). Alguns autores sugerem a existência 38 espécies (Feng; Ryan; Xiao, 2018), e mais de 40 genótipos de *Cryptosporidium* spp., (uma vez que não há informações suficientes para classificar esses genótipos em novas espécies), dentre as quais 19 podem infectar humanos (Robinson; Elwin; Chalmers, 2019).

O *C. parvum* é um importante agente etiológico que tem como principais hospedeiros os mamíferos, sendo comumente encontrado em bezerros (Ryan; Fayer; Xiao, 2014), podendo causar diarreia em animais nas primeiras semanas de vida, nos quais a gravidade e duração da doença podem conduzir à morte por desidratação (Ryan et al., 2016; Santín, 2020).

Em relação ao diagnóstico imunológico de *Cryptosporidium* spp. observa-se que, mesmo com utilização de anticorpos monoclonais, no caso de testes comerciais disponíveis, como Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e ELISA de captura ou a RID usando anticorpos policlonais contra antígenos totais de oocistos de *C. parvum*, não há discriminação da espécie do parasito (Teixeira et al., 2011).

Uma metodologia pouco utilizada em testes de diagnóstico imunológico é a aplicação de imunoglobulinas purificadas de ovos de galinhas imunizadas (classe IgY), em substituição das de mamíferos (IgG), com várias vantagens, como a alta produção e rendimento, processo simples de purificação das imunoglobulinas, reduzido número de animais imunizados, alta afinidade e especificidade, praticidade na colheita, a não necessidade de sangria ou eutanásia dos animais, o baixo custo e facilidade de manejo

¹ O artigo está nas normas da Revista *Veterinary Parasitology*. Vide anexo 2

(Michael et al., 2010). Em virtude da importância de *Cryptosporidium* spp. para a Saúde Única, referente aos testes imunológicos faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico desse parasito nos humanos, animais, amostras ambientais e de água, visto que as técnicas utilizadas têm baixa sensibilidade e especificidade, além do alto custo (Franco et al., 2012).

Partindo desse pressuposto, o objetivo nesse projeto foi avaliar a utilização dos anticorpos IgY policlonais em um ELISA de captura para detecção de antígenos solúveis de *C. parvum* em amostras fecais de bovinos, comparativamente à análise microscópica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (padrão-ouro).

2.4 Material e métodos

2.4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA, Unesp, Araçatuba, SP, protocolo de número 00436- 2019.

2.4.2 Amostras de fezes

A amostragem mínima necessária para a execução deste projeto, no nível de confiança de 95% e com precisão absoluta de 5%, foi calculada em 196 amostras, com uso de uma proporção populacional de 15% (Lwanga; Lemeshow, 1991). Como margem de segurança, foram colhidas 214 amostras, provenientes de bezerros de propriedades leiteiras do Município de Araçatuba - SP, e região. As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal, de animais com idade variando de um dia a três meses, machos e fêmeas. As amostras foram armazenadas a 4°C e divididas em duas alíquotas: uma foi adicionada formalina tamponada a 10% (1:4), para utilização no ELISA de captura e na outra solução de bicromato de potássio a 2,5% (concentração final) para purificação pela técnica de centrífugo-sedimentação em água/éter (Meloni; Thompson, 1996) e posterior leitura em microscopia óptica de campo claro, pela técnica de coloração negativa de verde malaquita (Elliot et al., 1999).

2.4.3 Purificação do anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos

Poedeiras comerciais foram imunizadas previamente com 75 µg de antígenos provenientes de oocistos de *C. parvum* rompidos, com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich), por via intramuscular, em vários locais da musculatura peitoral, em um volume total de 1mL (500 µl do antígeno diluído em PBS e 500 µl do adjuvante). A inoculação foi repetida nos dias 10, 20 e 30, utilizando o adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), com 50 µg de antígeno, com o objetivo de produção de IgY policlonal contra antígenos de parede de oocistos e esporozoítos, para utilização no ELISA de captura. Os anticorpos são passados passivamente para as gemas dos ovos e as gemas contendo esses anticorpos foram estocadas congeladas a -20°C até o processamento.

A purificação dos anticorpos IgY anti-oocistos rompidos presentes nas gemas dos ovos foi realizada inicialmente por meio do *Kit Pierce® Chicken IgY Purification Kit* (Thermo Scientific). Os anticorpos policlonais IgY purificados foram submetidos a outro processo de purificação por cromatografia de afinidade na coluna *Hi Trap IgY Purification HP*, com o uso do cromatógrafo *AKTA Pure* (GE Health Care), com a utilização do *software UnicornV5*, com tampão de ligação (NaH_2PO_4 20mM, Na_2SO_4 0,5M, pH 7,5).

Inicialmente, foi feito o equilíbrio da coluna com cinco volumes de tampão de ligação, seguido da injeção da amostra. Posteriormente foram aplicados 10 volumes de coluna do tampão de ligação para a lavagem e a eluição da IgY foi realizada com 10 volumes de coluna do tampão de eluição (NaH_2PO_4 20mM, pH 7,5). A IgY policlonal foi colhida purificada e concentrada. Após a eluição, a coluna de afinidade foi regenerada com tampão de limpeza (NaH_2PO_4 20mM com 30% de isopropanol, pH 7,5) e reequilibrada com 5 volumes de tampão de ligação e armazenada em etanol 20%.

A visualização dos produtos purificados foi feita em gel SDS-PAGE 16%, com tampão de corrida Tris-Glicina 1x (tris-base 25mM, glicina 250mM e SDS 0,1%), corado com *Page Blue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific), seguindo o protocolo *Fast Staining Protocol* para mini-géis. A quantificação de proteínas nas amostras foi feita com *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma-Aldrich).

2.4.4 ELISA de captura

O ELISA de captura foi realizado em duplicata, para detecção de antígenos fecais de *C. parvum*. O teste foi realizado em bloco, em placas de 96 poços de fundo plano, com alta ligação (Greiner Bio-one Brasil). Estas foram sensibilizadas com IgG monoclonal de camundongo anti-peptídeo da glicoproteína GP15 (GenScript) (400ng/poço) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 9,0 (total de 100 µl/poço) e mantidas a 4°C, por 16 horas. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X/Tween 20 0,05% (PBS-T) pH 7,2 e bloqueadas por uma hora, a temperatura ambiente, com 300 µl de PBS-T adicionado com soro fetal bovino 10%. Após o bloqueio, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Um total de 100 µl de amostras foi acrescentado e incubado por três horas em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. A IgY policlonal anti-oocistos rompidos foi incorporada na diluição de 1:50 em PBS-T com soro fetal bovino 10%, com incubação, por uma hora, em temperatura ambiente. Amostras negativas e positivas provenientes de bovinos, determinadas por meio de PCR, foram utilizadas como controles nas mesmas diluições. Após essa etapa, foi realizada quatro lavagens com PBS-T e as placas foram incubadas com 100 µl de solução contendo PBS-T, soro fetal bovino 10% e conjugado composto por IgG de coelho anti- IgY de galinha, conjugada à peroxidase (*Anti-chicken IgY-whole molecule- peroxidase*, Sigma- Aldrich), na diluição de 1:3000, por uma hora, em temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes com PBS-T, e em seguida foi agregado 100 µl de tetramethylbenzidine (TMB) para revelação da placa, ao abrigo da luz. O bloqueio da reação foi feito com 100 µl de H₂SO₄ 2N. As placas foram lidas com emprego do leitor iMark™ Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD) com filtro de 450 nm. Em todas as reações, foi acrescentado o branco (formol 10%).

2.4.5 Análise estatística

Os resultados positivos obtidos por meio das técnicas supracitadas foram comparados por meio do coeficiente de concordância Kappa, para evidenciar se há alguma correlação entre os resultados de ambas as técnicas. O teste McNemar foi utilizado para verificar se existe diferença significativa entre a proporção de resultados positivos entre as técnicas, as estatísticas foram consideradas significativas quando

$p < 0,05$. O ponto de corte “*cut off*” e os valores da sensibilidade e especificidade dos testes foram determinados por meio do programa computacional *GraphPad Prisma 6.0*, pela curva *ROC*, considerando a microscopia como teste padrão-ouro para separar as amostras em grupos (amostras positivas e amostras negativas).

2.5 Resultados

Durante o período de colheita (março/2019 a setembro/2020), foram colhidas 214 amostras. Após processamento e concentração das mesmas, estas foram submetidas a análise microscópica, sendo observada positividade para *Cryptosporidium* spp. em 17,29% (37/214).

Imunoglobulinas IgY policlonais anti-oocistos rompidos foram purificadas das gemas congeladas de forma eficiente. As IgY colhidas nas frações do cromatógrafo AKTA Pure (GE Health Care) foram visualizadas em gel SDS-Page 16% (Fig. 2).

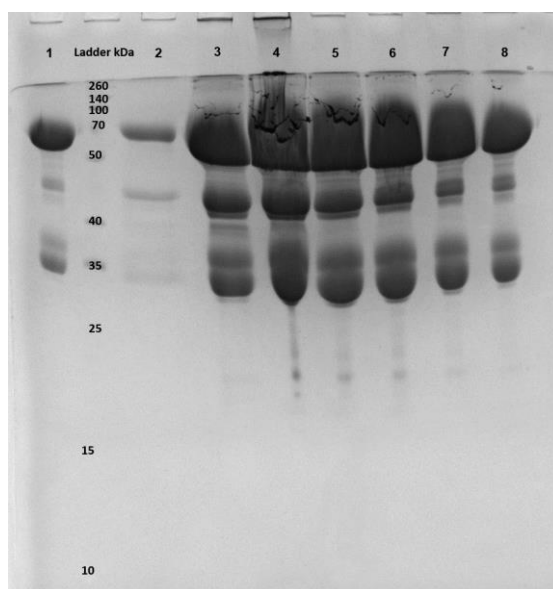


Figura 2. Gel SDS-PAGE 16% das frações colhidas após purificação de IgY policlonal. Ladder kDa: marcador de peso molecular; 1-2: frações contendo pequena quantidade de IgY policlonal colhida; 3-8: frações com presença de grande quantidade de IgY anti- GP15 purificada e concentrada. IgY possui peso molecular de 180kDa, onde consiste de duas subunidades: cadeia pesada de 67-70kDa e cadeia leve de 22-30 kDa. Os outros fragmentos observados sugerem também a presença de outras gamaglobulinas, particularmente a IgM, com a molécula íntegra ou fragmentada.

O ELISA de captura foi bem-sucedido ao utilizar 400ng/poço de anticorpo de captura (IgG monoclonal anti-GP15), 100 µl de antígeno solúvel de amostra fecal, IgY policlonal anti-oocistos rompidos (1:50) e conjugado anti-IgY (1:3000). Pelo ELISA de captura foi possível detectar 20,09% (43/214) de positividade para antígenos fecais de *C. parvum* nestas amostras (Apêndice A). Das amostras analisadas 79,91% (171/214) foi negativo para *Cryptosporidium* spp. em ambas as técnicas.

Pelo teste de Kappa, o coeficiente de concordância entre as duas técnicas foi considerado excelente (0.9079). Importante notar que por meio do teste de McNemar houve diferença significativa entre a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas empregadas ($p < 0,05$).

Uma vez que o requisito principal, definido no presente trabalho, foi a sensibilidade do teste, os melhores resultados foram observados adicionando a curva ROC com ponto de corte em 0.4315, onde a sensibilidade observada foi de 100% e especificidade foi de 95,6% (Tab. 1 e Fig. 3). Neste estudo, a microscopia foi usada como teste padrão de ouro, capaz de detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais.

Tabela 1. Ponto de corte e melhores resultados da curva ROC para ELISA de captura contra glicoproteína GP15, com 100% de sensibilidade.

curva ROC	Sensibilidade	95% IC*	Especificidade	95% IC
	%		%	
> 0.4315	100	91,59% para 100,0%	95,60	91,52% para 98,08%

*Intervalo de Confiança

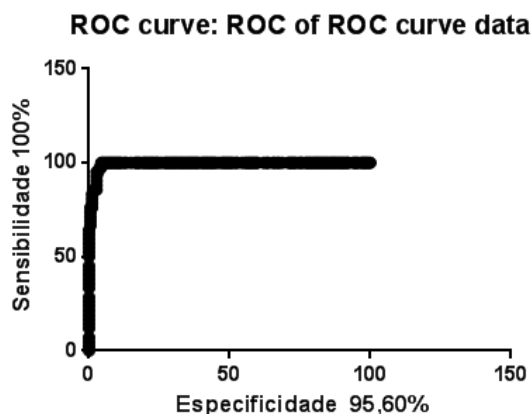


Figura 3. Curva ROC das médias de 214 amostras positivas e negativas no teste de ELISA, sensibilidade e especificidade variando de 0 a 100%.

Os valores de absorbância de 450nm das amostras fecais foram significativamente maiores nas amostras positivas do que nas amostras negativas (Fig. 4). Assim, as taxas de positividade para antígenos fecais foram correlacionadas com a existência de casos de diarreia por *C. parvum* (Fig. 5), porém algumas amostras não diarreicas apresentaram positividade no teste, assim o ELISA de captura foi eficaz também na detecção de antígenos fecais em amostras de animais assintomáticos.

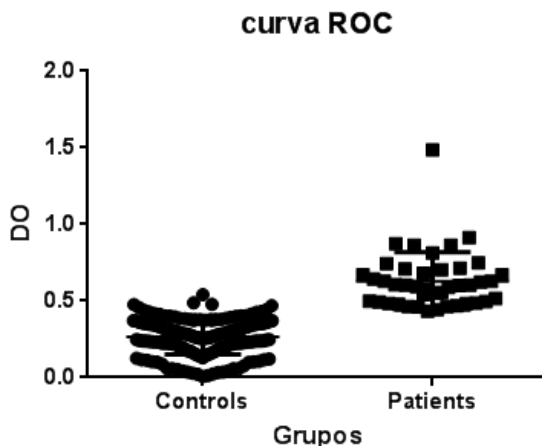


Figura 4. Boxplot de grupos de animais *patients* (positivos) e *controls* (negativos) e suas respectivas Densidades Ópticas 450nm, nos testes ELISA e microscopia.

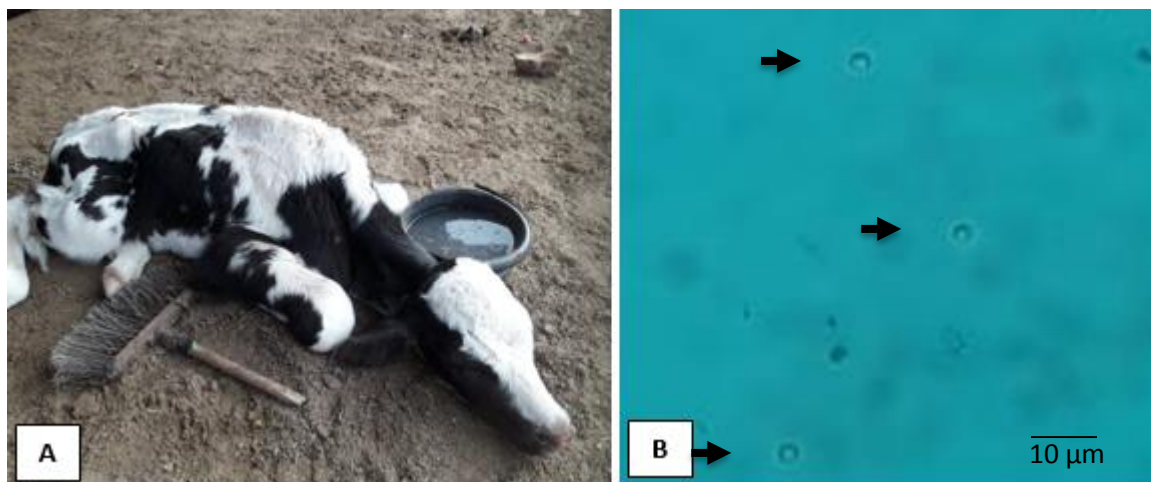


Figura 5. A: Bezerro infectado com *C. parvum*; B: setas: oocistos de *C. parvum* presentes na amostra fecal do bezerro da Figura 4A; coloração negativa de verde malaquita, objetiva de 40X.

2.6 Discussão

No presente trabalho foi realizado pela primeira vez uso anticorpo monoclonal anti-peptídeo da proteína GP15 em conjunto com o anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos de ovos de galinhas imunizadas, no ELISA de captura para detecção antígenps fecais de *C. parvum*. Nós constatamos pelo ELISA de captura, a ocorrência de *C. parvum* em 20,09% (43/214) na população de bovinos do presente estudo, sendo que, na microscopia foi observado 17,29% (37/214) de amostras positivas para este parasito.

Os kits comerciais para detecção de criptosporidiose são fundamentados no ELISA), (RID) e, em alguns casos ensaios imunocromatográficos. O ELISA de captura e a imunocromatografia são utilizados para detecção de antígenos solúveis de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais humanas e com menor frequência em animais (Jex et al., 2008).

O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. também pode ser feito com uso de técnicas de biologia molecular, com maior frequência pela reação em cadeia da polimerase e suas variantes, seguida de digestão do fragmento amplificado por enzimas de restrição (RFLP) ou sequenciamento, com o intuito de identificação da espécie, genótipo ou subtipo do parasito (Jex; Gasser, 2010^a; Jex; Gasser, 2010^b; Ryan, Hijjawi, 2015).

A detecção de criptosporidiose normalmente é feita por meio da técnica de coloração de esfregaços de fezes visando à detecção de oocistos. Além de serem trabalhosas e demoradas, essas técnicas necessitam de muita experiência para interpretação e apresentam baixa sensibilidade (Tai et al., 2019).

O teste Kappa, utilizado para evidenciar se há concordância entre as duas técnicas, apresentou um coeficiente de concordância Kappa excelente de acordo com os critérios sugeridos por Rosner (2006). Importante notar que por meio do teste de McNemar há diferença significativa entre a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas empregadas, porém esse resultado é bom, é esperado que ocorrerá essa diferença, uma vez que buscávamos um teste mais sensível do que a microscopia. Portanto, o ELISA de captura pode ser um método ideal para determinar a presença de *C. parvum* em fazendas segundo Ichikawa-Seki et al., (2019), sendo a microscopia utilizada somente em casos que necessita de uma confirmação.

O rastreio da biblioteca de cDNA com uso de soros imunes tem auxiliado na identificação de proteínas que estão potencialmente envolvidas na invasão de células hospedeiras. Acredita-se que algumas dessas proteínas identificadas podem estar envolvidas na invasão do *Cryptosporidium* spp., como Gp900, Gp40/15 (Gp60), Cpa135, Cp2, P23 e TRAP-C1 (Bouzid et al., 2013).

As determinações biológicas da especificidade do hospedeiro em *Cryptosporidium* spp. não são evidentes, decorrente do insuficiente conhecimento em torno dos componentes essenciais empregados na invasão de células hospedeiras por esporozoítos (Liu et al., 2016). A maioria dessas proteínas são O-glicosiladas e muitas são mucinas, sendo que o processo de invasão é considerado conservado nos parasitos do Filo Apicomplexa. Apesar disso, outras proteínas não identificadas também podem participar da invasão e da especificidade de hospedeiros de *Cryptosporidium* spp. (Li et al., 2017).

A clivagem proteolítica C-terminal da glicoproteína GP60 dá origem a glicoproteína GP15 e GP40 (Cevallos et al., 2000; Strong et al., 2000; Winter et al., 2000). A fração GP40 é responsável pelo agrupamento da maior parte das regiões de polimorfismo (Preidis et al., 2007). Já GP15 está ancorada na membrana do esporozoíto

por uma porção glicosilfosfatidil inositol (O'Connor et al., 2007) e, além de ser a fração mais imunogênica é a fração mais conservada do gene (Borad; Ward, 2010), sendo assim, uma grande concorrente na detecção de antígenos solúveis, em virtude de desenvolver uma resposta celular e humoral no desenvolvimento de vacinas e no hospedeiro (O'Connor et al., 2007).

A estratificação da reação na nossa pesquisa foi feita utilizando anticorpo monoclonal anti-peptídeo da proteína GP15 devido ao fato desta proteína ser mais imunogênica e aumentar especificidade do teste (Cevallos et al., 2000; Borad; Ward, 2010). A IgY policlonal anti-ocistos rompidos foi utilizada pois possibilita mais sítios de reconhecimento possíveis em antígenos solúveis a serem detectados, uma vez que foi produzida contra oocistos e esporozoítos de *C. parvum*.

A utilização de imunoglobulinas IgY purificadas de ovos de galinhas imunizadas, em substituição das imunoglobulinas IgG de mamíferos tem diversas vantagens, como a alta produção e rendimento, processo simples de purificação, reduzido número de animais, alta afinidade e especificidade, praticidade na colheita, a não necessidade de sangria, além do baixo custo e facilidade de manejo (Michael et al., 2010). Apesar dessas vantagens, essa imunoglobulina possui baixa utilização no uso de diagnósticos, fato que poderia ser mais explorado.

A curva ROC foi utilizada para avaliar o desempenho do ELISA de captura a partir do ponto de corte, onde os valores devem ser considerados positivos ou negativos (Hajian-Tilaki, 2013). A validade de um teste diagnóstico é comprovada pela mensuração de sua capacidade de detectar resultados verdadeiramente positivos e a capacidade de valores de um teste com alta precisão mostrando todos os valores de sensibilidade (eixo Y) contra valores de especificidade (eixo X), apresentando uma medida de precisão total, independente de um limiar particular (Delacour et al., 2005).

Os valores da absorbância de 450nm foram significativamente maiores nas amostras positivas do que em amostras negativas. Estes resultados foram semelhantes aos de uma pesquisa realizada no Japão, onde foram utilizados antígenos recombinantes de CpP23, CpGP15 e CpGP60, com DO415, para detectar anticorpos específicos de *C. parvum* em soro de amostras sanguíneas. Porém, nessa pesquisa, diferente da nossa os

soros de controle positivo não estavam em concordância entre si, mas isso pode ser explicado pelo fato deles terem sensibilizado a placa com dois antígenos, diferente de nós que utilizamos somente um antígeno (Ichikawa-Seki et al., 2019).

2.7 Conclusão

O uso do anticorpo monoclonal anti-peptídeo da proteína GP15 conjuntamente com o anticorpo IgY policlonal anti-oocistos rompidos no ELISA de captura permitiu a determinação de amostras positivas para *C. parvum*, comparativamente com o padrão-ouro. Dessa forma, o teste ELISA de captura desenvolvido no presente trabalho, pode ser usado como uma ferramenta para identificação e triagem em amostras de bovinos.

2.8 Agradecimentos

Financiamento: Bolsa de Mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a mestranda Débora Regina Romualdo da Silva.

Conflitos de interesse: Nenhum.

2.9 Referências

- Borad, A., Ward, H., 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. **Future Microbiol.** 5, 507-519.
- Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clin. Microbiol. Rev.** 26, 115–134.
- Cacciò, S.M., Chalmers, R.M., 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.** 22, 471–80.

Cevallos, A.M., Bhat, N., Verdon, R., Hamer, D.H., Stein, B., Tzipori, S., 2000. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. **Infec. Immun.** 68, 5167-5175.

Checkley, W., White, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.M., Fayer, R., griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri, W.A., Priest, J.R., Roos, D. S., Striepen, B., Thompson, R.C., Ward, H.D., Van Voorhis, W.A., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E.R., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **Lancet Infect. Dis.** 5, 85–94.

Delacour, H., Servonnet, A., Perrot, A., Vigezzi, J.F., Ramirez, J.M., 2005. ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology. **Ann. Biol. Clin.**

Dumaine, J.E., Tandel, J., Striepen, B., 2019. *Cryptosporidium parvum*. **Trends Parasitol.** doi:10.1016/j.pt.2019.11.003.

Elliot, A., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., 1999. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 45, 139–142.

Feng, Y., Ryan, U.M., Xiao, L., 2018. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. **Trends Parasitol.** doi:10.1016/j.pt.2018.07.009.

Franco, R.M.B., Branco, N., Leal, D.A.G., 2012. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água.

Vet. Pat. Trop. 41, 119-135.

Hajian-Tilaki K., 2013. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian J. Intern. Med.** 4, 627-635.

Hemphill, A., Müller, N., Müller, J., 2019. Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. **Pathogens**.

Ichikawa-Seki, M., Fereig, R.M., Masatani, T., Kinami, A., Takahashi, Y., Kida, K., Nishikawa, Y., 2019. Development of CpGP15 recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* for detection of the specific antibodies in cattle. **Int. J. Parasitol.** 69, 8–12.

Jex, A., Gasser, R.B., 2010^a. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Exp. Parasitol.** 124, 90-97.

Jex, A., Gasser, R.B., 2010^b. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies - Research review. **Biotechnol. Adv.**

Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B., 2008. *Cryptosporidium* — biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnol. Adv.** 26, 304-317.

Li, B., Wu, H., Li, N., Su, J, Jia, R., Jiang, J., Xiao, L., 2017. Preliminary Characterization of MEDLE-2, a Protein Potentially Involved in the Invasion of *Cryptosporidium parvum*. **Front. Microbiol.** doi:10.3389/fmicb.2017.01647.

Liu, S., Roellig, D.M., Guo, Y., Li, N., Frace, M.A., Tang, K., 2016. Evolution of mitosome metabolism and invasion-related proteins in *Cryptosporidium*. **BMC Medical. Genom**, doi: 10.1186/s12864-016-3343-5.

Lwanga, S.K., Lemeshow, S., 1991. Sample size determination in health studies: a practical manual. **WHO**.

Meloni, B.P., Thompson, R.C.A., 1996. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **J. Parasitol.** 82, 757-762.

Michael, A; Meenatchisundaram, S.; Parameswari, G.; SubbraJ, T.; Selvakumaran, R.; Ramalingam, S, 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian J. Sci Technol.** 3.

O'connor, R.M., Wanyiri, J.W., Cevallos, A.M., Priest, J.W., Ward, H.D., 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with GP15. **Mol. Biochem. Parasitol.** 156, 80–83.

Preidis, G.A., Wang, H.C., Lewis, D.E., Castellanos-Gonzalez, A., Rogers, K.A., Graviss, E.A., 2007. Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* GP15. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 77, 583–585.

Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2019. *Cryptosporidium* Diagnostic Assays: Molecular Detection. *Cryptosporidium*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_2. Acessado em: 20 ago 2020.

Rosner, B. 2006. Fundamentals of Biostatistics. 6th. ed., **Duxbury Press**, Boston.

Ryan, U., Fayer. R., Xiao, L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitol.** 141, 1667-85.

Ryan, U., Hijjawi N., 2015. New developments in *Cryptosporidium* research. **Int. J. Parasitol**, 45, 367–373.

Ryan, U., Zahedi, A., Paparini, A. 2016. *Cryptosporidium* in humans and animals - a one health approach to prophylaxis. **Parasite. Immunol.**

Santín, M., 2012. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **N. Z. Vet. J.**

Santín, M., 2020. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 36, 223–238.

Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. **Infec. Immun.** 68, 4117-4134.

Tai, L., Li, J., Yin, J., Zhang, N., Yang, J, He Li, Yang, Z., Gong, P., Zhang, X., 2019. A novel detection method of *Cryptosporidium parvum* infection in cattle based on *Cryptosporidium parvum* virus 1, **Acta Biochim. Biophys. Sin.** 51, 104–111.

Teixeira, W.F.P., Coelho, W.M.D., Nunes, C.M., Meireles, M.V., 2011. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Rev. Bras. de Parasitol. Vet.** 20, 269-273.

Thompson, R.C.A., Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infect. Genet. Evol.** 40, 315 – 323.

Wegayehu, T., Karim, R., Anberber, M., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., 2016. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species in dairy calves in Central Ethiopia. **PLoS One**.

Winter, G., Gooley, A.A., Williams, K. L., Slade, M.B., 2000. Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*, **Funct. Integr. Genomics.** 1, 207–217.

Xiao, L., Feng, Y., 2017. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food Waterborne Parasitol.** 8–9, 14–32.

**APÊNDICE A. Média dos resultados do ELISA usados na curva ROC.
Padrão ouro: microscopia.**

(continuação)

Positivas	Média DO	Negativas	Média DO
1	0,709	1	0,254
2	0,485	2	0,138
3	0,643	3	0,323
4	0,604	4	0,237
5	0,605	5	0,344
6	0,912	6	0,265
7	0,714	7	0,371
8	0,576	8	0,311
9	0,516	9	0,235
10	0,588	10	0,415
11	0,483	11	0,224
12	0,464	12	0,285
13	0,671	13	0,291
14	0,749	14	0,487
15	0,874	15	0,417
16	0,477	16	0,362
17	0,495	17	0,404
18	0,627	18	0,215
19	0,554	19	0,286
20	1,485	20	0,402
21	0,629	21	0,476
22	0,492	22	0,360
23	0,482	23	0,368
24	0,460	24	0,378
25	0,433	25	0,379
26	0,462	26	0,426
27	0,624	27	0,331
28	0,680	28	0,307
29	0,671	29	0,314
30	0,445	30	0,324
31	0,553	31	0,261
32	0,540	32	0,540
33	0,812	33	0,288
34	0,601	34	0,164
35	0,467	35	0,225

(continuação)

Positivas	Média DO	Negativas	Média DO
36	0,744	36	0,237
37	0,594	37	0,393
		38	0,399
		39	0,379
		40	0,477
		41	0,315
		42	0,247
		43	0,318
		44	0,240
		45	0,225
		46	0,254
		47	0,428
		48	0,280
		49	0,270
		50	0,412
		51	0,239
		52	0,349
		53	0,470
		54	0,355
		55	0,043
		56	0,021
		57	0,396
		58	0,378
		59	0,310
		60	0,316
		61	0,371
		62	0,361
		63	0,430
		64	0,289
		65	0,043
		66	0,116
		67	0,166
		68	0,233
		69	0,125
		70	0,172
		71	0,012
		72	0,173
		73	0,233

(continuação)

Positivas	Média DO	Negativas	Média DO
		74	0,455
		75	0,058
		76	0,006
		77	0,052
		78	0,229
		79	0,105
		80	0,445
		81	0,341
		82	0,438
		83	0,352
		84	0,259
		85	0,199
		86	0,115
		87	0,027
		88	0,372
		89	0,386
		90	0,259
		91	0,366
		92	0,278
		93	0,265
		94	0,298
		95	0,237
		96	0,379
		97	0,285
		98	0,345
		99	0,348
		100	0,307
		101	0,238
		102	0,347
		103	0,296
		104	0,281
		105	0,357
		106	0,373
		107	0,370
		108	0,286
		109	0,033
		110	0,320
		111	0,224

(continuação)

Positivas	Média DO	Negativas	Média DO
		112	0,219
		113	0,346
		114	0,229
		115	0,101
		116	0,303
		117	0,024
		118	0,036
		119	0,058
		120	0,384
		121	0,248
		122	0,076
		123	0,058
		124	0,233
		125	0,224
		126	0,343
		127	0,259
		128	0,216
		129	0,146
		130	0,121
		131	0,375
		132	0,156
		133	0,297
		134	0,213
		135	0,232
		136	0,152
		137	0,306
		138	0,113
		139	0,353
		140	0,401
		141	0,276
		142	0,130
		143	0,143
		144	0,22
		145	0,151
		146	0,196
		147	0,103
		148	0,236
		149	0,221

(continuação)

Positivas	Média DO	Negativas	Média DO
		150	0,194
		151	0,200
		152	0,246
		153	0,196
		154	0,340
		155	0,237
		156	0,228
		157	0,378
		158	0,253
		159	0,213
		160	0,300
		161	0,242
		162	0,188
		163	0,174
		164	0,349
		165	0,224
		166	0,403
		167	0,236
		168	0,321
		169	0,329
		170	0,330
		171	0,386
		172	0,273
		173	0,352
		174	0,268
		175	0,354
		176	0,185
		177	0,336

APÊNDICE B. Referências da Introdução Geral

- AL-SABI, M. N.; GAD, J. A.; RIBER, U.; KURTZHALS, J. A.; ENEMARK, H. L. New filtration system for efficient recovery of waterborne *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. **J. Appl. Microbiol.** v. 119, p. 894–903, 2015.
- BOUZID, M.; HUNTER, P. R.; CHALMERS, R. M.; TYLER, K. M. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 26, p. 115–134, 2013.
- BROOK, E. J.; HART, A. C.; FRENCH, N. P.; CHRISTLEY, R. M. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. **Vet. J.** v. 179, p. 378–382, 2009.
- BURET, A. G.; MOTTA, J. P.; ALLAIN, T.; FERRAZ, J.; WALLACE, J. L. Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: A role for iron? **J. Biomed. Sci.** v. 26, p. 1, 2019.
- CARDOSO, R.; SOARES, H.; HEMPHILL, A.; LEITAO, A. Apicomplexans pulling the strings: Manipulation of the host cell cytoskeleton dynamics. **Parasitol.** v. 143, p. 957–970, 2016.
- CHALMERS, R. M.; CAMPBELL, B. M.; CROUCH, N.; CHARLETT, A.; DAVIES, A. P. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven cryptosporidium assays used in the UK. **J. Med. Microbiol.** v. 60, p. 1598–1604, 2011.
- CHECKLEY, W.; WHITE, A. C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X. M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C.D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI, W. A.; PRIEST, J. R.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C.; WARD, H. D.; VAN VOORHIS, W. A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E.R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **Lancet Infect. Dis.** v. 15, p. 85–94, 2015.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **J. Protozool.** v. 33, p.289-296, 1986.
- DRINKALL, E.; WASS, M. J.; COFFEY, T. J.; FLYNN, R. J. A rapid IL-17 response to *Cryptosporidium parvum* in the bovine intestine. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 191, p. 1–4, 2017.
- FENG, Y.; RYAN, U. M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. **Trends Parasitol.**, 2018. doi:10.1016/j.pt.2018.07.009.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 24, p. 110–40, 2011.

FEREIG, R. M.; ABDELBAKY, H. H.; IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Development and evaluation of the first immunochromatographic test that can detect specific antibodies against *Cryptosporidium parvum*, **Acta Tropica**, v. 185, p. 349–356, 2018. doi:10.1016/j.actatropica.2018.06.019.

FERREIRA JÚNIOR. Á.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JÚNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii* specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **Plos One**. v. 7, p. 7, 2012.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Rev. Pat. Trop.** v. 41, p. 119-135, 2012.

GARGALA, G.; FRANÇOIS, A.; FAVENNEC, L.; ROSSIGNOL, J. F. Activity of halogenothiazolides against *Cryptosporidium parvum* in experimentally infectados imunossuprimidos gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 57, p. 2821–2823, 2013.

HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.** v. 49, p. 918–924, 2011.

HEMPHILL, A.; MÜLLER, N.; MÜLLER, J. Thiazolides, a novel class of anti-infective drugs, effective against viruses, bacteria, intracellular and extracellular protozoan parasites and proliferating mammalian cells. **Antiinfect. Agents**, v. 11, p 22–30, 2013.

HEMPHILL, A.; MÜLLER, N.; MÜLLER, J. Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. **Pathogens**, v.8, p. 116, 2019.

HOWE, D. K.; GAJI, R. Y.; MROZ-BARRETT, M.; GUBBELS, M. J.; STRIEPEN, B.; STAMPER, S. Sarcocystis neurona merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-related sequences. **Infect. Immun.** v. 73, p. 1023–1033, 2005.

ICHIKAWA-SEKI, M.; AITA, J.; MASATANI, T.; SUZUKI, M.; NITTA, Y.; TAMAYOSE, G.; ISO, T.; SUGANUMA, K.; FUJIWARA, T.; MATSUYAMA, K.; NIIKURA, T.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, H.; YAMAKAWA, K.; INOKUMA, H.; ITAGAKI, T.; ZAKIMI, S.; NISHIKAWA,

Y. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two different Japanese prefectures, Okinawa and Hokkaido. **Parasitol. Int.** v. 64, p. 161–166, 2015.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* — biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotech. Adv.**, v. 26, p. 304-317, 2008.

KARANIS, P.; ALDEYARBI, H. M. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. **Int. J. Parasitol.** v. 41, p. 1231–1242, 2011.

LA HOZ, R. M.; MORRIS, M. I.; Ast Infectious Diseases Community of Practice. Intestinal parasites including *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia*, and *Microsporidia*, *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides*, schistosomiasis, and *Echinococcus*: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clin. Transpl.** v.33, p. 1-16, 2019.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. **Food Agric. Immunol.** v. 10, p. 29-36, 1998.

MASUR, H.; BROOKS, J. T.; BENSON, C. A.; HOLMES, K. K.; PAU, A. K.; KAPLAN, J. E. National Institutes of Health; Centers for Disease Control and Prevention; HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** v. 58, p. 1308–1311, 2014.

MCDONALD, V.; KORBEL, D. S.; BARAKAT, F.M.; CHOUDHRY, N.; PETRY, F. Innate immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. **Parasite Immunol.** v. 35, p. 55–64, 2013.

MICHAEL, A; MEENATCHISUNDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN, R.; RAMALINGAM, S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian J. Sci Technol.** v. 3, p.468-474, 2010.

MIURA, V. C.; AOKI, S. M.; PEITL JUNIOR, P.; PIRES, L. C.; DALMAGRO, P.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Evaluation of recombinant *Cryptosporidium hominis* GP60 protein and anti-GP60 chicken polyclonal IgY for research and diagnostic purposes. **Rev. Bras. de Parasit. Vet.** v. 26, p. 205-210, 2017.

O'CONNOR, R. M.; WANYIRI, J. W.; CEVALLOS, A. M.; PRIEST, J. W.; WARD, H. D. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein GP40 localizes to the sporozoite surface by association with GP15. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 156, p. 80–83, 2007.

PREIDIS, G. A.; WANG, H. C.; LEWIS, D. E.; CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; ROGERS, K. A.; GRAVISS, E. A. Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* GP15. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 77, p. 583–585, 2007.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes. and Infection.**, p. 1-13, 2004.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium* Diagnostic Assays: Molecular Detection. **Cryptosporidium**, p. 11–22, 2019. doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_2, 2019.

RYAN, U.; HIJJAWI, N.; XIAO, L. Food borne cryptosporidiosis. **Int. J. Parasitol.** v. 48, p. 1–12, 2018.

RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPARINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals- a one health approach to prophylaxis. **Parasite Immunol.** 38, 535–547, 2016.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **N. Z. Vet. J.**, v. 61, p.1–10, 2013.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonosis. **Vet. Parasitol.** v. 149, p. 29-40, 2007.

SOLIMAN, A.; EL-ADAWY, A.; ABD EL-AAL, A. A.; ELMALLAWANY, M. A.; NAHNOUSH, R. K.; EIAGHNI, A. R. A.; NEGM, M. S.; MOHSEN, A. Usefulness of sunlight and artificial UV radiation versus chlorine for the inactivation of *Cryptosporidium* oocysts: An in vivo animal study. Open Access Maced. **J. Med Sci.** v. 6, p. 975–981, 2018.

THOMPSON, A. Review of “Cryptosporidium and cryptosporidiosis” by Ronald Fayer and Lihua Xiao (eds.). **Parasit. Vectors**, v. 1, p. 47, 2008. doi:10.1186/1756-3305-1-47

VANATHY, K.; PARIJA, S. C.; MANDAL, J.; HAMIDE, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cryptosporidiosis: a mini review. **Trop. Parasitol.** v. 7, p. 72-80, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2020.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp. Parasitol.**, v. 124, p. 80–9, 2010.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 1239-1255, 2008

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 309-323, 2008.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discov. Today**. v. 8, p. 364-371, 2003.

ANEXO 1 - Ofício de aprovação do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da utilização de anticorpos IgY para detecção de antígenos fecais de *Cryptosporidium parvum* utilizando ELISA de captura em amostras fecais bovinos**", Processo FOA nº 00436-2019, sob responsabilidade de Marcelo Vasconcelos Meireles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Junho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 28 de Fevereiro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Março de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of IgY antibodies use for the fecal antigens detection of *Cryptosporidium parvum* using sandwich ELISA in faecal samples from cattle**", Protocol FOA nº 00436-2019, under the supervision of Marcelo Vasconcelos Meireles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 25, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 28, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 28, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP. 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone: (18) 3636-3234 Email: CEUA_oeua@foa.unesp.br

Scanned by TapScanner

ANEXO 2 - Normas de Publicação da Revista



VETERINARY PARASITOLOGY

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)

AUTHOR INFORMATION PACK

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



ISSN: 0304-4017

DESCRIPTION

The journal *Veterinary Parasitology* has an open access mirror journal, *Veterinary Parasitology: X*, sharing the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review.

This journal is concerned with those aspects of **helminthology**, **protozoology** and **entomology** which are of interest to **animal health** investigators, veterinary practitioners and others with a special interest in **parasitology**. Papers of the highest quality dealing with all aspects of disease prevention, pathology, treatment, epidemiology, and control of parasites in all domesticated animals, fall within the scope of the journal. Papers of geographically limited (local) interest which are not of interest to an international audience will not be accepted. Authors who submit papers based on local data will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership. Or they can submit to the journal's companion title, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, which welcomes manuscripts with a regional focus.

Parasitological studies on **laboratory animals** fall within the scope of *Veterinary Parasitology* only if they provide a reasonably close model of a disease of **domestic animals**. Additionally the journal will consider papers relating to **wildlife** species where they may act as disease reservoirs to domestic animals, or as a zoonotic reservoir. Case studies considered to be unique or of specific interest to the journal, will also be considered on occasions at the Editors' discretion. Papers dealing exclusively with the taxonomy of parasites do not fall within the scope of the journal.

Studies on rickettsial disease organisms (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Eperythrozoon*) will be considered for publication in *Veterinary Parasitology*, but only if the paper deals with vector transmission of these organisms to domesticated animals, or if zoonotic. Studies on *Rickettsia* per se will not be accepted.

Studies dealing with **parasite control** by means of natural products, both *in vivo* and *in vitro*, fall within the scope of the journal, but only if well documented and with therapeutically relevant minimum inhibitory concentrations of the active compound(s) being clearly demonstrated.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for International Organizations of Medical Sciences. (Obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o W.H.O., Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland.)

AUDIENCE

Research Workers and Practitioners in veterinary medicine, Animal Health Investigators and others with a special interest in parasitology, veterinary pharmaceutical industry.

IMPACT FACTOR

2019: 2.157 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS Citation Index
Elsevier BIOBASE
Helminthological Abstracts
PubMed/Medline
Index Catalog of Medical and Veterinary Zoology
Index Veterinarius
Protozoological Abstracts
Veterinary Bulletin
Scopus
Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Referativnyi Zhurnal VINITI-RAN (Russian Academy of Sciences)

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

Andy Greer, Lincoln University Faculty of Agriculture Horticulture Viticulture, Christchurch, New Zealand
Martin K. Nielsen, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States
Michael P. Reichel, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong
Theo de Waal, University College Dublin, Dublin, Ireland

Book Review Editors

Gad Baneth, Hebrew University of Jerusalem The Koret School of Veterinary Medicine, Jerusalem, Israel
Elias Papadopoulos, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Editorial Advisory Board

Rodney Brown Besler, Brown Besler Parasitology Pty Ltd, Albany, Australia
Frederic Beugnet, Boehringer Ingelheim Animal Health, Lyon, France
Dwight Bowman, Cornell University, Ithaca, New York, United States
Luis Cardoso, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal
Edwin Claerebout, Ghent University Department of Virology Parasitology and Immunology, Mellebeke, Belgium
Matthew James Denwood, University of Copenhagen Department of Veterinary and Animal Sciences, Frederiksberg, Denmark
Philippe Dorchies, National Veterinary School Toulouse, Toulouse, France
Pierre Dorny, Institute of Tropical Medicine Antwerp, Department of Biomedical Sciences, Antwerp, Belgium
Geoffrey Fosgate, University of Pretoria, Pretoria, South Africa
Caroline Frey, University of Bern, Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, Bern, Switzerland
Stanny Geerts, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium
Claudio Genchi, University of Milan, Milan, Italy
John Gilleard, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada
Luis F. Pita Gondim, Federal University of Bahia, School of Veterinary Medicine / Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, Salvador, Brazil
Dan Howe, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States
Ikuro Igarashi, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan
Anja Joachim, University of Veterinary Medicine Vienna, Wien, Austria
Pirkko Jokelainen, State Serum Institute, Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Infectious Disease Preparedness, Laboratory of Parasitology, Copenhagen, Denmark
Ray Kaplan, The University of Georgia, Athens, Georgia, United States
Thomas Kennedy, Eleven Bravo LLC, Phoenix, AZ, United States
Andrew Kotze, CSIRO Queensland Bioscience Precinct, St Lucia, Australia
Marcelo Labruna, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

Adrian Luis Lifschitz, Pharmacology Laboratory, Tandil Veterinary Research Center (CIVETAN) (UNCPBA-CICPBA-CONICET), Faculty of Veterinary Sciences, UNCPBA, Tandil, Argentina
David Lindsay, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States
Alan A. Marchiondo, Zoetis Genetics, Santa Fe, NM, United States
Marcelo Molento, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil
Jorge Morales-Montor, National Autonomous University of Mexico Department of Immunology, Ciudad de México, Mexico
Vinny Naidoo, University of Pretoria, Pretoria, South Africa
Pia Olafson, USDA-ARS Knippling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, Texas, United States
Domenico Otranto, University of Bari Section of Clinical Veterinary and Animal Production, Bari, Italy
Roberto Papini, University of Pisa, Pisa, Italy
Kurt Pfister, Ludwig Maximilians University Munich, Munich, Germany
William (Bill) Pomroy, Massey University, Wellington, New Zealand
Dierk Rebesid, Lohmann Animal Health GmbH und Co KG, Cuxhaven, Germany
Gereon Schares, Friedrich-Loeffler-Institute Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald, Germany
Theo Schetters, University of Pretoria, Department of Veterinary Tropical Diseases, Pretoria, South Africa
Johann Schröder, Meat and Livestock Australia, North Sydney, Australia
Jan Ślapeta, University of Sydney Faculty of Science Sydney School of Veterinary Science Laboratory of Veterinary Parasitology, Camperdown, New South Wales, Australia
Ian Sutherland, Hopkirk Research Institute, Palmerston North, New Zealand
Andrew Thompson, Murdoch University, Murdoch, Australia
Donato Traversa, University of Teramo Veterinary Hospital, Teramo, Italy
Gert Venter, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa
Georg Von Samson-Himmelstjerna, Free University of Berlin, Berlin, Germany
Lihua Xiao, South China Agricultural University College of Veterinary Medicine, Guangzhou, China
Dante Zarlenga, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, United States
Xing-Quan Zhu, Shanxi Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Taiyuan, China
Annetta Zintl, University College Dublin, Dublin, Ireland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Veterinary Parasitology has an open access mirror journal, Veterinary Parasitology: X. Both journals share the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review. The difference between the journals is the access model under which the journals will publish your work and the Indexation status.

As Veterinary Parasitology is indexed in MEDLINE, Veterinary Parasitology: X is eligible for fast inclusion in PubMed Central (PMC) without any additional review. Once the new journal is accepted, all existing articles will be indexed retrospectively. Veterinary Parasitology: X is already indexed in Scopus, and so will receive a CiteScore Tracker figure in 2020, and a full CiteScore in 2021. As a new journal Veterinary Parasitology: X does not yet have a Journal Impact Factor. We will apply for inclusion in the Science Citation Index and other relevant abstracting and indexing services once we have met requirements for number of articles/issues published.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Letters to the Editor
4. Book reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Book Review Editors noted below:

Dr G. Baneth
School of Veterinary Medicine,
Hewbrew University,
Rehovot,
Israel
gad.baneth@mail.huji.ac.il

Dr E. Papadopoulos
Faculty of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki,
Thessaloniki,
Greece
eliaspap@vet.auth.gr

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](#).

Animal Welfare

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology. Please include an animal welfare statement under the heading "Animal welfare statement" at the end of the text.

Declaration of competing 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 conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. This statement will be published within the article if accepted. [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. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

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.

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.

Open access

Authors wishing to publish open access can choose to publish open access in *Veterinary Parasitology: X*, the open access mirror journal of *Veterinary Parasitology*. One, unified editorial team manages the peer-review for both titles using the same submission system. The authors choice of publishing model will determine in which journal, *Veterinary Parasitology* or *Veterinary Parasitology: X*, the accepted manuscript will be published. The choice of publishing model will be blinded to referees, ensuring the editorial process is identical.

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 Author Services.

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.

A cover letter is required for each new submission. It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of *Veterinary Parasitology*. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

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. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/vetpar>.

PREPARATION

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.](#)

If at all possible please refrain from sending chasers to the Editorial Office asking about the status of your paper under review, as the Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. 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.

Article structure

Manuscripts should have **numbered lines** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

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.

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 as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights 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).

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.

The abstract should be clear, descriptive and not more than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of *e* are often more conveniently denoted by *exp*.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ¹⁸O.

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

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.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the *Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD)* published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

Submission of sequence data to databases

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDJB databases under the accession numbers: XXXX, XXXX). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type.

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. 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. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. 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.

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) 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.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

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.

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.

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/veterinary-parasitology>

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

Reference Style

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Journal abbreviations source

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

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

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 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

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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.

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/vetpar>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

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 [Author Services](#). 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>