

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**O FUNGO *Duddingtonia flagrans*: CONTROLE
BIOLÓGICO DE NEMATÓDEOS PARASITAS DE
BOVINOS À CAMPO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marta Bañolas Jobim

Santa Maria, RS, Brasil, 2006

**O FUNGO *Duddingtonia flagrans*: CONTROLE BIOLÓGICO
DE NEMATODEOS PARASITAS DE BOVINOS À CAMPO**

por

Marta Bañolas Jobim

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Mário Luiz de la Rue

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**O FUNGO *Duddingtonia flagrans* : CONTROLE BIOLÓGICO DE
NEMATODEOS PARASITAS DE BOVINOS À CAMPO**

elaborada por
Marta Bañolas Jobim

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mário Luiz de la Rue, Dr.
(Presidente/Orientador)

Janio Morais Santurio, Dr.
(Doutor/UFSM)

Cybele Esteves Almeida
(Doutora/UFSM)

Santa Maria, 16 de maio de 2006.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), na pessoa de seu Coordenador, Prof. João Francisco de Oliveira, pela acolhida e auxílio.

Ao Prof. Mário Luiz de la Rue pelo privilégio de sua amizade, interesse e inestimável orientação.

À equipe do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) e ao Prof. Jânio Morais Santurio, pelo valioso auxílio e disponibilização do material para o experimento, oportunizando a realização deste estudo.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFSM, pela ajuda incansável nas análises laboratoriais.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (CCR/UFSM), pelas preciosas e oportunas sugestões.

À equipe do Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análise Laboratorial (NIDAL/UFSM), por franquear suas instalações.

Aos professores de estatística da UFSM, José Henrique Souza da Silva e Luis Felipe Dias Lopes, pela valiosa ajuda na análise estatística do trabalho.

Ao estudante e bolsista em medicina veterinária Messias Ratslaff, pela incansável ajuda na rotina do experimento.

Aos funcionários da propriedade Cerro da Cruz, Clarisse e Cláudio, pela dedicação e ajuda no dia-a-dia do campo.

Aos meus pais, Gilberto, Gilcéia e Verinha, que possibilitaram e estimularam a busca deste sonho.

E finalmente, ao meu esposo Gustavo, pela força e razão de meu desejo de vencer.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

O FUNGO *Duddingtonia flagrans*: CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓDEOS PARASITAS DE BOVINOS À CAMPO

AUTORA: MARTA BAÑOLAS JOBIM

ORIENTADOR: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de maio de 2006.

O controle biológico é um método para diminuir a população de parasitas pela utilização de antagonista natural. No presente estudo, testou-se a eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controle de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos criados a campo no município de Julio de Castilhos. Utilizaram-se 20 bezerros, distribuídos igualmente em duas áreas formadas por pastagem nativa. O grupo A foi tratado com o fungo *D. flagrans*, cultivado em sorgo, numa concentração de 1×10^6 clamidósporos/Kg de peso animal, misturados em ração de manutenção, diariamente, durante oito meses. O grupo B serviu como controle e não recebeu fungo, apenas ração. Foram coletadas amostras para contagem de ovos por grama de fezes (OPG), semanalmente. Mensalmente foram realizadas coprocultura para identificar as espécies de larvas de nematódeos, pesagem dos animais, colheita de sangue para determinar contagem sanguínea de série vermelha e coleta de pasto para contagem das larvas na pastagem. Dados de temperatura e índice pluviométrico foram registrados diariamente. O OPG foi reduzido no grupo tratado, em média 56,84% nos últimos 3 meses de experimento, variando entre 40,44 a 67,14% no grupo tratado ($P < 0,001$). A coprocultura demonstrou que os principais nematódeos encontrados foram dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* em uma percentagem de 47,9 e 35,3%, respectivamente. A contagem de larvas na pastagem obteve um percentual de redução 77,05% no grupo tratado ao final do experimento ($P < 0,01$). Pôde-se concluir com este estudo, que o papel do fungo *Duddingtonia flagrans*, é sem dúvida importante, principalmente na diminuição do OPG e na redução significativa de larvas na pastagem. Portanto, este fungo nematófago é uma ferramenta biológica eficaz para ser empregado em um controle integrado de nematódeos de bovinos criados a campo.

Palavras-chaves: controle biológico, nematódeo de bovinos, *Duddingtonia flagrans*, fungo nematófago, bovinos.

ABSTRACT

THE FUNGUS *Duddingtonia flagrans*: BIOLOGICAL CONTROL OF NEMATODES PARASITES OF CATTLE IN THE FIELD

The biological control is an alternative method to reduce the population of parasites by the use of natural antagonist. In the present study, the efficacy of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* was tested to control gastrointestinal nematodes parasites of cattle livestock in the field. Twenty calves were used, distributed equally in two distinct plots formed for native pasture. . Group A was treated with *D. flagrans* fungus, cultivated in sorghum, in a concentration with 1×10^6 clamidospores/kg body weight, mixed with maintenance ration, each day, during eight months. Group B served as a control and did not receive the fungus. Samples for faecal egg count (FEC), were collected each week. There were monthly counts in faecal cultures to identify the species of nematodes larvae, weight of the animals, collection of blood to determine red cell counts and collection of pasture to the counting of larvae. Temperature and rainfall data were registered daily. The FEC reduced around 56,84% in the last 3 months of the experiment, with a variation between 40,44 and 67,14% in the treated group ($P < 0,001$). The faecal cultures demonstrated that the main nematodes been found were *Cooperia* and *Haemonchus* in a percentage of 47,9 and 35,3%, respectively. The counting of larvae in the pasture showed a reduction percentage around 77,05% in the treated group at the end of experiment ($P < 0,01$). It could be concluded with this study, that fungus *Duddingtonia flagrans* is, without a doubt important, mainly in the reduction of the FEC and the significant reduction of larvae in the pasture. Therefore, this nematophagous fungus is efficient as a biological tool to be used in an integrated control of nematodes of bovine raised in the fields.

Key words: biological control, bovine nematodes, *Duddingtonia flagrans*, nematophagous fungus, cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 - O cocho do grupo A à esquerda e o cocho do grupo B à direita.....	19
Fotografia 2 - Ração para a manutenção de peso misturada ao sorgo contendo o fungo <i>D. flagrans</i>	20
Fotografia 3 - Os 20 animais do experimento formando um grupo homogêneo.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste T, ao nível de significância de 5% entre os grupos A (tratado) e B (controle) dos principais parasitas.....	29
Tabela 2: Análise de Variância, utilizando delineamento em medidas repetidas, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, entre o percentual de Hematócrito dos grupos A (tratado) e B (controle), no período de 6 meses.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Contagem de OPG obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P<0,002$) entre os grupos: tratado (A) na coluna escura e controle (B) na coluna clara. Houve diferença estatística também entre os meses (*) de experimento ($P<0,01$). A linha pontilhada demonstra o percentual de redução (%) na contagem de OPG entre os grupos.....26

Figura 2 – Contagem de OPG, excluindo o animal mais parasitado de cada grupo, obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P<0,001$) entre os grupos: tratado (A) na coluna escura e controle (B) na coluna clara. Houve diferença estatística também entre os meses (*) de experimento ($P<0,01$). A linha pontilhada demonstra o percentual de redução (%) na contagem de OPG entre os grupos, no período de oito meses.....26

Figura 3 - Contagem de larvas (L3) na pastagem por quilo de matéria seca obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P<0,01$) entre os grupos: tratado (A) na linha preta contínua (a) e controle na linha cinza (b). A linha pontilhada (c) demonstra a percentagem de redução de larvas (L3) na pastagem, no período de oito meses.....28

Figura 4 - Temperatura máxima nas colunas escuras, temperatura mínima nas colunas claras e o índice pluviométrico na linha contínua, durante o período de oito meses, na região de Júlio de Castilhos (RS).....30

Figura 5 - Série histórica de temperatura máxima nas colunas escuras, temperatura mínima nas colunas claras e o índice pluviométrico na linha contínua, dos meses de agosto a março, no período de 1994 a 2003 , na região de Júlio de Castilhos (RS).....31

Figura 6 – Evolução da média do peso dos animais (Kg) entre o grupo tratado (A) em linha contínua e o grupo controle (B) em linha interrompida, no período de oito meses de experimento, não obteve diferença significativa pelo teste de Duncan ($P>0,67$).....32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1Objetivos	13
1.1.1 Geral.....	13
1.1.2 Específicos.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3 MÉTODOS E TÉCNICAS	18
3.1 Caracterização do local do experimento	18
3.2 Desenho experimental	18
3.3 Análises laboratoriais	21
3.3.1 Amostras de pastagem.....	21
3.3.2 Coprocultura.....	22
3.3.3 Contagem de ovos nas fezes.....	22
3.3.4 Hemograma.....	23
3.4 Pesagem	23
3.5 Dados meteorológicos	23
3.6 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, o parasitismo gastrointestinal ocupa um lugar de destaque (MACRAE, 1993). Diversos programas de controle vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos das endoparasitoses na produção extensiva de bovinos. Entre eles, os que têm enfocado a diminuição de larvas infectantes na pastagem através do uso de compostos anti-helmínticos, que por sua vez, diminui a população de parasitas nos animais adultos. Entretanto, apesar dos compostos anti-helmínticos serem utilizados como uma das principais ferramentas, seu uso possui algumas limitações tais como: resíduos de drogas em produtos animais (PADILHA, 1996), efeitos tóxicos em organismos não alvos no meio ambiente (STRONG et al., 1996,) e a resistência anti-helmíntica (FAO, 2003 e KAPLAN, 2004).

Com o intuito de desenvolver outros métodos para minimizar o uso de anti-helmínticos nas estratégias de controle dos nematódeos de ruminantes, especialmente em sistemas de produção em pastoreio contínuo, o controle biológico parece ser uma realidade, oferecendo uma alternativa eficiente e segura na redução da população de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais nas pastagens (LARSEN, 1999 e MOTA et al., 2003).

O termo controle biológico se aplica a utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, diminuindo a um limiar sub-clínico e economicamente aceitável numa população, de um agente causador de perdas produtivas na atividade pecuária ou agrícola (GRØNVOLD et al., 1996a). Desta forma, o uso de várias espécies de fungos nematófagos que atacam as formas larvárias dos parasitas na pastagem tem sido muito estudadas, como alternativa de controle biológico dos nematódeos de ruminantes (WALLER, 1998 e SAUMELL & FERNÁNDEZ, 2000).

Duddingtonia flagrans é um fungo que possui grande capacidade de produzir clamidósporos. Estes permanecem viáveis depois de ingeridos pelos bovinos e são

eliminados pelas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo e predando os nematódeos através de hifas adesivas (LARSEN et al., 1991; LARSEN et al., 1992 e WAGHORN et al. 2003). Por isso o controle de nematódeos em bovinos, na última década, tem atraído muita atenção e sido foco de inúmeras pesquisas (LARSEN et al., 1995; NANSEN et al., 1995; FERNÁNDEZ et al., 1999a; SARKUNAS et al. 2000; FAEDO et al., 2002; DIMANDER et al., 2003a e 2003b; EYSKER et al., 2005).

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a eficácia do fungo *Duddingtonia flagrans*, fermentado em sorgo e administrado diariamente por via oral, como alternativa de controle biológico de nematódeos em bovinos jovens criados à campo, nas condições ambientais existentes no município de Júlio de Castilhos, Rio Grande do Sul, Brasil, pelo período de 8 meses

1.1.2 Específicos

- Avaliar a evolução da carga parasitária nos animais e no campo, após administração do fungo *D. flagrans*, através de exames quantitativo e qualitativo de contagem de ovos nas fezes e coprocultura, respectivamente, assim como a contagem de larvas nas pastagens.
- Correlacionar a eficácia do fungo *D. flagrans* com os fatores climáticos de temperatura e índice pluviométrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O parasitismo gastrintestinal de nematódeos é um significativo fator limitante nos sistemas de produção de animais criados a campo, no mundo todo (WAGHORN, 2003). Os prejuízos estão associados a diminuição e ao retardo na produção, o elevado custo ocasionado pelo uso de antihelmínticos nos tratamentos profilático e curativo e, em casos extremos, a morte dos animais constituindo como alguns dos maiores problemas vinculados aos gastos com o parasitismo gastrintestinal. O conhecimento sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos, viabilidade larvar e o sistema de produção são os requisitos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo do parasitismo (MOTA et al., 2003). Quando estas informações não são levadas em conta, o parasitismo aumenta e acarreta diferentes patologias as quais interferem no ganho de peso, ingestão de alimentos e utilização de matéria seca, retardo na idade reprodutiva, decréscimo na capacidade reprodutiva e mortalidade em animais seriamente afetados (CHARLES, 1992).

Os programas de controle de endoparasitas gerados nas últimas décadas, são baseados principalmente na informação epidemiológica de cada região e focados no uso de compostos antihelmínticos com alta eficácia e baixa toxicidade. Estes programas têm encontrado resultados eficientes mas ao mesmo tempo limitados, pois a resistência antihelmíntica já foi detectada há algumas décadas (PRICHARD, 1990) assim como resíduos de drogas nos alimentos (PADILHA, 1996) e sua ação em organismos não alvo (BIRD & HERD, 1995; IGLESIAS, 1998), impedindo o avanço da tecnologia química. Por esses motivos o desenvolvimento de métodos alternativos de controle têm sido bastante estimulados.

Para enfrentar os obstáculos da tecnologia química, muitos métodos alternativos têm sido intensamente estudados no intuito de prevenir e controlar o parasitismo por nematóides gastrintestinais de bovinos, como: o desenvolvimento de vacinas (EMERY & WAGLAND, 1991), a identificação de marcadores moleculares associados à resistência dos parasitos (GASBARRE et al., 1990) e a utilização de microorganismos no controle das formas livres

presentes no ambiente (GILL & LE JAMBRE, 1996). A utilização destes microorganismos tais como fungos (BARRON, 1977), bactérias (STIRLING, 1985), protozoários (CANNING, 1973), artrópodes (LEHMAN & REID, 1993), entre outros, considerados como parasitas ou predadores de nematódeos, têm sido descritos como métodos alternativos de controle biológico.

Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda a população é regulada por antagonistas de forma espontânea na natureza. Na ausência de controladores naturais disponíveis no ambiente, a população de um determinado organismo poderia aumentar indiscriminadamente. Desta forma, o termo controle biológico é definido como um método ecológico desenvolvido pelo homem para diminuir a população parasitária à densidades sub-clínicas aceitáveis ou para conservar esta população em níveis não prejudiciais usando antagonistas naturais vivos (GRØNVOLD et al., 1996a). Conforme MOTA (2003), na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitas, contudo, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais. Devido a isso, causa menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos.

Para ser selecionado como um eficiente controle biológico, os antagonistas naturais necessitam possuir algumas qualidades, como: especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e sobreviver às condições ambientais no local em que o controle é realizado, bem como ser efetivo no controle do organismo alvo (GRØNVOLD et al., 1996b). Além disso, a seleção de um agente antagonista está baseada na capacidade de produção em escala industrial, nos custos relacionados na produção, na competitividade com as drogas tradicionais e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. (MOTA, 2003).

Os fungos nematófagos possuem uma grande variedade e diversidade. Eles são habitantes naturais do solo (GRAY, 1987) e das fezes dos animais (SAUMELL, 1999), sendo o seu padrão de colonização influenciado pelas condições climáticas (FERNÁNDEZ, et al., 1999b; SAUMELL, 1998). Os fungos nematófagos possuem várias vantagens, como: alta atividade reprodutiva e ciclo de vida curto; algumas espécies produzem esporos o que aumenta sua resistência dentro e fora dos animais; mantém-se em fase saprofítica na ausência do hospedeiro e, principalmente, não são patógenos para os animais.(LARSEN, 1999)

As espécies de fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *M. thaumasium* são identificadas como nematófagas (BARRON, 1977) e têm sido estudadas quanto ao seu potencial como agentes controladores biológicos de helmintos

gastrintestinais de bovinos (ALVES et al., 2003; ARAÚJO et al., 1993, 1998, 1999; DIMANDER et al., 2003a e 2003b; GOMES et al., 1999; LARSEN et al., 1995).

O fungo *Duddingtonia flagrans* é a espécie mais estudada no controle das nematodioses gastrintestinais de animais domésticos (EYSKER et al., 2005; LARSEN, 1999; MOTA et al., 2003). Uma das características deste fungo que os diferencia dos demais fungos nematófagos é que este suporta a passagem pelo trato gastrintestinal (TGI) dos ruminantes devido à produção de grande número de estruturas de resistência esféricas (clamidósporos) de parede grossa (LARSEN et al., 1991; LARSEN et al., 1992). Após passar pelo TGI, os fungos nematófagos em geral, produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. Os clamidósporos de *D. flagrans* ao serem eliminados juntamente com as fezes, se diferenciam e podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (BARRON, 1977). As hifas apresentam formatos variando entre elíptica e ovóide com um septo mediano e morfologia de 25-50 µm de comprimento por 10-15µm de largura (COOKE & GODFREY, 1964). O aprisionamento do nematódeo às redes tridimensionais é seguido pela penetração destas hifas na cutícula do nematóide, ocorrendo dentro da larva, a digestão dos conteúdos internos (MOTA et al., 2003). Na fase inicial deste processo, o nematóide se mantém aderido ao fungo por meio de uma substância fibrilar adesiva rica em fosfatase ácida, que também é responsável pela degradação da cutícula. O processo de penetração acontece em uma hora e após desaparece, e está associado à presença de corpos densos ricos em enzima que atuam como peroxissomos (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1988). A fase final de penetração da cutícula parece ser resultado de força mecânica (VEENHUIS et al., 1985). Então, quanto maior a motilidade dos nematóides no bolo fecal, maior o estímulo ao fungo para a produção destas armadilhas (NANSEN et al., 1988).

No Brasil, os primeiros estudos de controle biológico *in vitro* com fungos nematófagos avaliaram a eficácia de *Arthrobotrys spp.* e *Monacrosporium elliposporum* no controle de larvas de *Haemonchus placei* de bovinos (ARAÚJO et al., 1992; ARAÚJO et al., 1993). Somente estudos mais recentes foram descritos utilizando o fungo *D. flagrans* no Brasil. GARCIA (2000) estudou a incorporação e armazenamento em suplementos alimentares de ruminantes dos fungos *Arthrobotrys musiformis* e *Duddingtonia flagrans*. Já SANTOS (2000) coletou, isolou, identificou e produziu, em escala massal, fungos nematófagos em 3 regiões brasileiras diferentes e avaliou as características biológicas do fungo *D. flagrans*. Entretanto, não há descrição publicada de experimentos desenvolvidos *in vivo* sobre a eficácia do fungo *D. flagrans* em bovinos jovens nas condições climáticas da região sul do Brasil. É

importante salientar que as condições climáticas de cada região brasileira possuem características distintas e que podem influenciar tanto na eficácia deste fungo como no ciclo biológico dos parasitas. A formação das redes de aprisionamento do fungo tem sido melhor a 30°C, produzindo de 700-800 armadilhas/cm²/2 dias, quando induzidos por 20 nematóides/cm² em agar, conforme experimento de GRØNVOLD (1996b).

A dosagem de esporos do fungo *D. flagrans* administrada para determinar um adequado controle é bastante diversificada nos diferentes experimentos realizados em várias partes do mundo, e depende da espécie de ruminantes a ser estudada (LARSEN et al., 1995; NANSEN et al., 1995; WOLSTRUP et al., 1994). Já SARKUNAS et al. (2000) concluíram que a dosagem do fungo *D. flagrans* para bovinos com 10⁶ clamidósporos/kg de peso de animal vivo, diariamente, resultou em significativa redução da infectividade de larvas na pastagem e conseqüentemente infecção leve nos animais. Contudo, outros estudos realizados a fim de comparar o efeito de diferentes doses fúngicas, mostraram que para aplicar corretamente o controle biológico, deve se levar em conta, não somente a dose fúngica a ser usada, mas também outros fatores tais como o nível de carga inicial de larvas na pastagem e carga animal (FERNÁNDEZ et al., 1999a).

3 MÉTODOS E TÉCNICAS

3.1 Caracterização do local do experimento

O experimento foi realizado em uma propriedade rural no município de Júlio de Castilhos, região central do Estado do Rio Grande do Sul, localizado na longitude de 53,69°W e latitude de 29,19°S, a 514 metros de altitude. A vegetação natural do município foi classificada como savana gramínea-lenhosa com floresta de galeria. Estes campos nativos são compostos por *Paspalum notatum*; *P. plicatulum*; *Eryngium ciliatum*; *E. horridum*; *Andropogon ternatus*; *Choloris polydactyla*; *Schizachyrium microstachyum*; *Aristida laevis*; *Piptochaetiu montevidensis* e *Erianthus* sp. (BANDINELLI et al., 2005).

3.2 Desenho experimental

Foram utilizados para o estudo, 20 bezerros machos não castrados, com idades entre 9 e 11 meses e peso médio de 144 Kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com 10 indivíduos em cada, denominados grupos A (tratamento) e B (controle). Cada grupo foi introduzido em um potreiro com 4 hectares perfazendo um total de 0,8 unidade animal (360 Kg) por hectare. Os potreiros contíguos foram cercados e divididos por cerca elétrica, tendo à disposição água e pastagem nativa. A pastagem diferida foi semeada a lanço com azevém, antes do início do experimento. Foi colocado um cocho em cada potreiro. O cocho do grupo A foi subdividido em dez compartimentos, com espaços de 50 cm, para que cada animal se alimentasse individualmente e recebesse a mesma quantidade de massa fúngica (Fotografia 1).



Fotografia 1 - O cocho do grupo A à esquerda e o cocho do grupo B à direita.

O fungo utilizado foi *Duddingtonia flagrans*, cepa ARSEF 5701 (Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures), obtido no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Após processo de fermentação a seco em sorgo estéril, o fungo atingiu concentração de $1,6 \times 10^6$ clamidósporos/grama de sorgo. Para os animais do grupo A, foram fornecidos 1×10^6 clamidósporos/ Kg de peso animal, diariamente, misturados a uma ração para a manutenção de peso, sendo a dose do fungo ajustada mensalmente conforme o aumento da média de peso dos animais. A ração era composta de 44% de trigoilho/aveia, 20% de milho, 35% de resíduos de soja e 1% de melaço. O tipo e a quantidade de ração foram igualmente fornecidos para ambos os grupos, durante todo o experimento (Fotografia 2).



Fotografia 2 - Ração para a manutenção de peso misturada ao sorgo contendo o fungo *D. flagrans* administrados ao grupo tratado (A).

Os animais, 15 dias antes de serem divididos em grupos, foram pesados e avaliados clinicamente quanto ao escore de condição corporal (ECC) proposto por WILDMAN et al. (1982) e EDMONSON et al. (1989) que varia de 1 a 5. A média do ECC de ambos os grupos resultou em 2,5 (Fotografia 3). Na mesma ocasião os animais foram tratados com ivermectina injetável (Ivomec®)¹ a 1% na dose de 1ml/50 kg de peso vivo.

¹ Merial Saúde Animal Ltda – Rua Barão de Jaraguá, 901, 14º andar, Campinas, São Paulo, CEP: 13015-001.



Fotografia 3 - Os 20 animais do experimento formando um grupo homogêneo.

3.3 Análises laboratoriais

3.3.1 Amostras de pastagem

Mensalmente as amostras eram colhidas em padrão de “zigue-zague” em toda a extensão dos dois poteiros (WRIGHT et al. 2003), procurando sempre colhe-las até as 10 horas da manhã. Cerca de 80% do material foi coletado perto do bolo fecal (a menos de 20 cm) e 20% longe (cerca de 1m) e colocados em sacos plásticos. As amostras eram encaminhadas imediatamente ao laboratório e refrigeradas. Parte do pasto colhido, em torno de 100g, era seco em estufa a 55°C durante 72 horas, no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análise Laboratorial (NIDAL/UFSM), para análise de matéria seca parcial. Na outra parte, pesou-se entre 600 a 800 gramas de pasto, e foram adicionadas de 5 a

7 litros de água com 10 ml de detergente não iônico (sabão neutro) e levemente friccionado por 5 minutos, repedindo-se a ação a cada 30 minutos, durante 3 horas. Após, o pasto era separado do líquido, primeiramente por uma peneira grossa (1 mm) e novamente, por uma peneira fina de 38 μ m onde eram retidas as larvas. O sedimento retido era retirado da peneira por jatos moderados de água e colocado em papel filtro sobre um cálice contendo água, por 24 horas em temperatura ambiente. No dia seguinte, o papel filtro era retirado e parte do conteúdo sobrenadante era desprezada, restando 30 ml de líquido com o sedimento no fundo. Este foi colocado em tubos de ensaio. Ao examinar, foram separadas 3 alíquotas de 0,5 ml do conteúdo do fundo do tubo e procedeu-se à contagem de larvas. O resultado encontrado foi transformado em número de larvas por kg de matéria seca (MOLENTO, 2001).

3.3.2 Coprocultura

A cada mês, foram coletadas fezes da ampola retal dos animais, separados individualmente em potes, identificados e armazenados sob refrigeração. As amostras eram encaminhadas ao laboratório para realização de coprocultura. Porções de fezes de cada animal do grupo A eram misturadas com serragem, umidificadas e mantidas em estufa para cultivar por 14 dias em temperatura constante de 27°C. Após era realizada a recuperação de larvas infectantes (L₃) segundo a técnica de ROBERTS & O'SULLIVAN (1950). As larvas foram preservadas com formol em 10% e posteriormente, quantificadas e identificadas de acordo com os critérios estabelecidos por UENO & GONÇALVES (1998).

3.3.3 Contagem de ovos nas fezes

Foram coletadas de cada animal, semanalmente, amostras de fezes da ampola retal, cujas amostras foram identificadas e mantidas sob refrigeração até o momento do exame laboratorial, que ocorria geralmente em 24 a 48 horas. A técnica utilizada foi a de GORDON & WHITLOCK (1939) modificada por LIMA (1989), para determinar a contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

3.3.4 Hemograma

As amostras de sangue total foram colhidas da veia jugular em tubo com anticoagulante (EDTA). Estas amostras foram imediatamente encaminhadas ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFSM, para análise de hemograma. O hematócrito foi estabelecido mediante técnica do micro hematócrito e os resultados se expressaram em percentual. Foram coletadas amostras mensalmente, durante 6 meses.

3.4 Pesagem

Mensalmente, o peso dos bovinos era mensurado individualmente. A pesagem dos animais serviu tanto para verificar a evolução do peso de cada animal de ambos os grupos, como para ajustar a dose do fungo no grupo A, através da média de peso do grupo tratado.

3.5 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de índice pluviométrico, temperatura máxima e mínima foram obtidos da base de dados da estação de São Martinho da Serra, a 20 quilômetros de distância do experimento. Esta base de dados pertence ao Centro de Previsões do Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC, 2005) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia. Os dados foram verificados diariamente e foram reagrupados para ter como base valores mensais de temperatura máxima e mínima expressos em C° (centígrados) e de índice pluviométrico expressos em mm (milímetros).

3.6 Análise estatística

Os dados de OPG, número de larvas recuperadas da pastagem e de meteorologia foram correlacionados e, logo após, aplicada análise de variância ANOVA utilizando delineamento

inteiramente casualizado. Os valores de OPG foram transformados (logaritimizadas) com o objetivo de equalizarem os dados (DIMANDER et al., 2003a). Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância (teste F) em nível de significância de 5% e através da regressão linear simples. As médias dos fatores qualitativos foram comparadas pelo teste de Duncan.

Os dados de peso, hematócrito e coprocultura foram analisados através de variância ANOVA, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%. Os dados estatísticos foram analisados pelo programa SAS (Statistical Analysis System), versão 8.02.

A eficácia dos resultados de OPG e larvas na pastagem foi determinada pelo percentual de redução entre o grupo tratado e o não tratado através da fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

onde X é o dado do grupo controle (B) e Y o dado do grupo tratado (A), sendo que X deve ser maior (>) que Y e diferente de zero (0), de acordo com a fórmula utilizada por TERRILL et al. (2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo optou-se pela a dosagem de 1×10^6 clamidósporos/ kg de peso animal por ser a concentração da cepa ARSEF 5701, disponibilizada pelo laboratório e por esta ser uma concentração eficaz nos experimentos realizados *in vivo* mas em condições climáticas distintas ao do local deste estudo. A concentração do fungo administrada em diferentes estudos é variável, mas conforme DIMANDER et al. (2003b) e FERNÁNDEZ et al. (1999a), a dosagem de 1×10^6 clamidósporos por quilo de peso vivo, em bovinos, demonstrou significativa redução no número de larvas na pastagem. Da mesma forma, outros estudos, em diferentes espécies, utilizando várias dosagens distintas, tiveram resultados significativos. TERRILL et al. (2004) utilizaram em caprinos, dosagens de fungo com 5×10^4 , 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 clamidósporos/kg de peso animal e obtiveram resultados significativos que variaram de 60,8 a 93,6% de redução de larvas na pastagem. PEÑA et al. (2000) reportaram redução de larvas de *Haemonchus contortus* entre 76,6 e 100% em culturas de fezes de ovelha contendo 5 concentrações diferentes de clamidósporos de *D. flagrans*, que variaram de $2,5 \times 10^4$ a 5×10^5 clamidósporos/ kg de peso animal. Apesar das doses serem variáveis nas diferentes espécies, para que o controle biológico seja corretamente aplicado, deve-se levar em conta também o nível inicial de larvas nas pastagens e carga animal (FERNÁNDEZ et al., 1999a) assim como as condições climáticas (EYSKER et al., 2005).

A contagem de OPG, ao longo do estudo, teve uma diferença significativa entre os dois grupos ($P < 0,002$). Na análise de percentual de redução entre o grupo A e B, pôde-se observar que o OPG, nos últimos 3 meses de experimento, diminuiu em média 56,84% na quantidade de ovos, variando entre 40,44 a 67,14%, como mostra a Figura 1. DIMANDER et al. (2003a e 2003b) obtiveram resultados semelhantes, onde o OPG reduziu cerca de 50% em bovinos tratados com o mesmo fungo e na mesma dosagem.

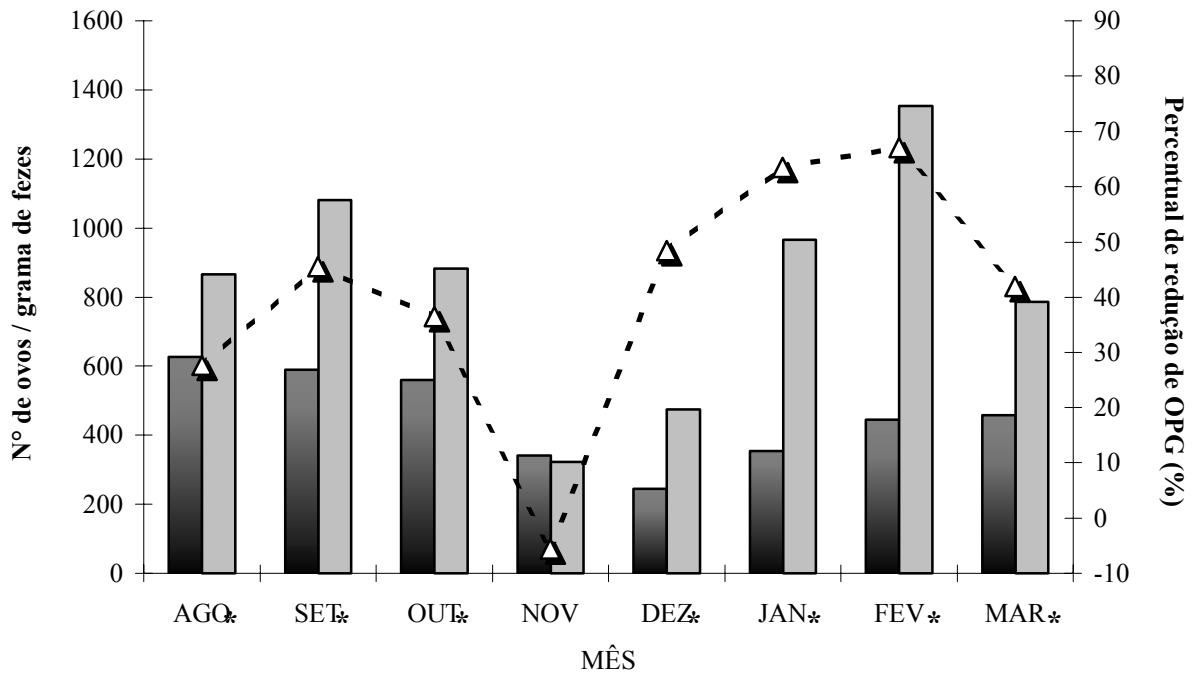


Figura 1 – Contagem de OPG obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,002$) entre os grupos: tratado (A) na coluna escura e controle (B) na coluna clara. Houve diferença estatística também entre os meses (*) de experimento ($P < 0,01$). A linha pontilhada demonstra o percentual de redução (%) na contagem de OPG entre os grupos.

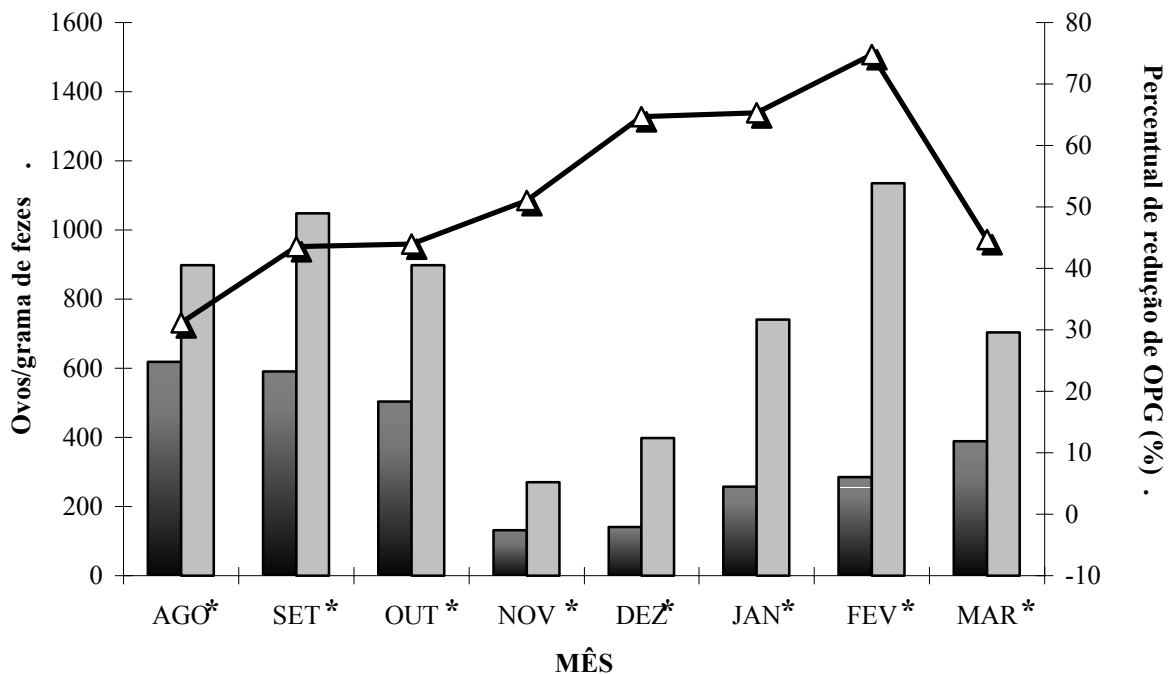


Figura 2 – Contagem de OPG, excluindo o animal mais parasitado de cada grupo, obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,001$) entre os grupos: tratado (A) na coluna escura e controle (B) na coluna clara. Houve diferença estatística também entre os meses (*) de experimento ($P < 0,01$). A linha pontilhada demonstra o percentual de redução (%) na contagem de OPG entre os grupos.

Na Figura 1, pode-se observar que no 4º mês de uso do fungo na alimentação dos bezerros (novembro), o OPG diminuiu em ambos os grupos em relação ao mês anterior. Da mesma forma, o percentual de redução de OPG chegou próximo a zero (0%) pela diferença do grupo A e B ser quase a mesma. Entretanto, este resultado não era esperado. Em uma nova análise do banco de dados foi verificado que um único animal do grupo tratado (A) possuía carga parasitária 10 vezes maior que os demais indivíduos do mesmo grupo. Ao excluir das análises estatísticas este indivíduo do grupo e o indivíduo com a maior carga parasitária do grupo controle (B), e realizando-se novamente o cálculo de percentual de redução observamos uma mudança significativa ($P > 0,001$), onde o percentual sobe para 59% no mês de novembro, conforme mostra a Figura 2. Isto se deve provavelmente, a resistência individual ao parasitismo. Conforme MORALES (2001) existem animais dentro de um rebanho que são caracterizados como respondedores, resilientes e sensíveis ou acumuladores de parasitas. Possivelmente este animal era um acumulador ou sensível, pois vinha apresentando este perfil desde o início do experimento.

Por outro lado, houve uma queda significativa no OPG de ambos os grupos nos meses de outubro/novembro. Isto se deve possivelmente, a redução do percentual de larvas na pastagem entre o mês de setembro e outubro (Figura 3), levando os animais a ingerirem menos larvas e, portanto, eliminarem menos ovos, bem como foi observado por DIMANDER et al. (2003 b). Outra hipótese a ser relatada é o fenômeno de autocura que os animais sofrem após o advento de um período de chuvas intensas, quando as contagens de ovos de vermes nas fezes caem, em virtude da eliminação da maior parte da carga de vermes adultos (URQUHART et al., 1996). Ao ingerem grande quantidade de larvas, como o ocorrido nos meses de outubro para novembro (Figura 3), o organismo sofre uma reação de hipersensibilidade tipo imediata a antígenos derivados das larvas em desenvolvimento. As larvas acabam sendo destruídas e conseqüentemente chegam poucas larvas na fase adulta que eliminarão os ovos.

Novamente a contagem de OPG voltou a crescer em dezembro possivelmente pelas condições climáticas de temperatura e de índice pluviométrico adequadas para o desenvolvimento do ciclo (Figura 2).

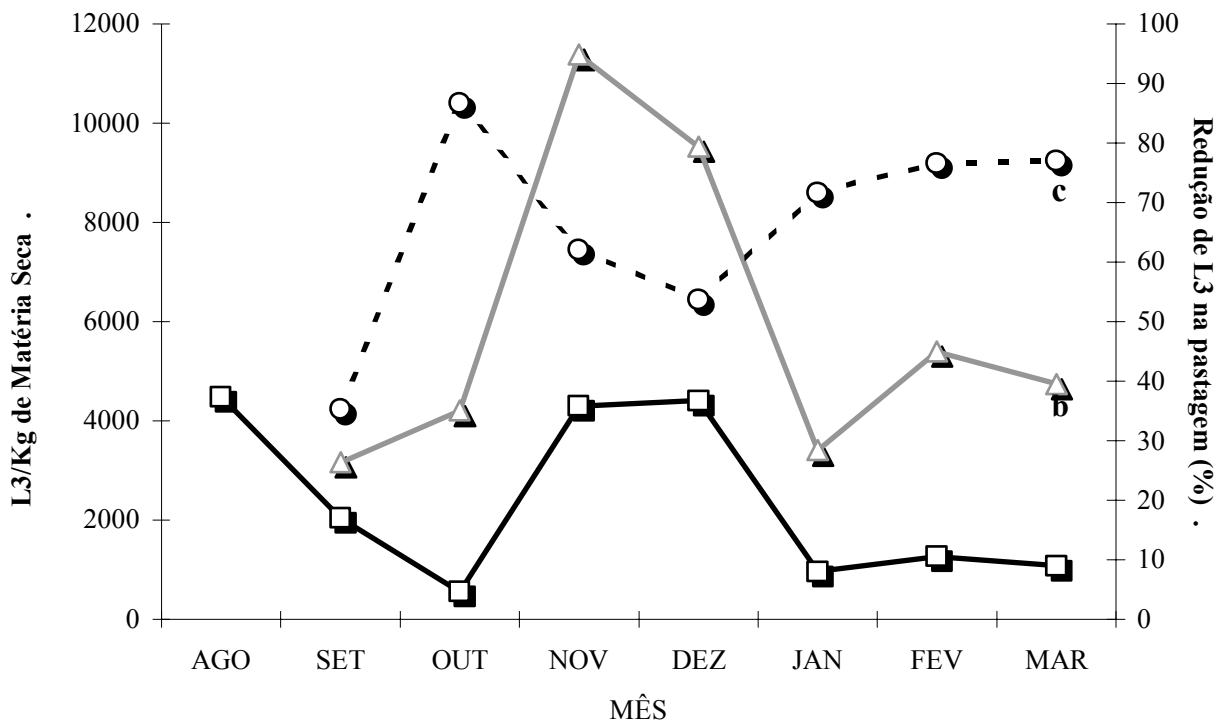


Figura 3 - Contagem de larvas (L3) na pastagem por quilo de matéria seca obteve diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,01$) entre os grupos: tratado (A) na linha preta contínua (a) e controle na linha cinza (b). A linha pontilhada (c) demonstra a percentagem de redução de larvas (L3) na pastagem entre os grupos, no período de oito meses.

A coprocultura demonstrou que o percentual dos principais nematódeos encontrados ao longo do estudo, em média, no grupo A e B, foram respectivamente: *Cooperia sp.* com 47,89 e 41,89% e *Haemonchus sp.* com 35,33 e 46,11%. Outras espécies encontradas em menor quantidade no grupo A e B respectivamente, foram: *Oesophagostomum sp.* (10,56 e 7,56%), *Ostertagia sp.* (5,33 e 3,11%), *Nematodirus sp.* (0,44 e 0,56%), *Trichostrongylus sp.* (0,33 e 0,56%), *Strongyloides sp.* (0,11 e 0,22%). Para os principais parasitas, *Cooperia sp.*, *Haemonchus sp.*, *Oesophagostomum sp.* e *Ostertagia sp.* verificou-se através do Teste T (Tabela 1), ao nível de significância de 5%, não haver diferença significativa na proporção de parasitas em relação aos grupos até o final do experimento. Estudo realizado por ARAÚJO et al. (2004), demonstraram que o fungo *D. flagrans* não é seletivo para um determinado gênero de parasitas, confirmando os resultados obtidos.

Tabela 1: Teste T, ao nível de significância de 5% entre os grupos A (tratado) e B (controle) dos principais parasitas.

Parasita	Grupo				p
	A (tratado)		B (controle)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
<i>Cooperia sp.</i>	47,89	15,87	41,89	18,57	NS
<i>Haemonchus sp.</i>	35,33	12,56	46,11	17,85	NS
<i>Oesophagostomum sp.</i>	10,56	11,16	7,56	6,62	NS
<i>Ostertagia sp.</i>	5,33	4,36	3,11	4,04	NS

p = nível mínimo de significância do Teste T

NS= não significativo

O fungo *D. flagrans* aprisiona os helmintos às redes tridimensionais e logo após segue-se a penetração das hifas na cutícula do nematóide onde ocorre o crescimento destas hifas e a digestão dos conteúdos internos (MOTA et al., 2003). Devido ao seu modo de ação, vários trabalhos têm demonstrado que *D. flagrans* é bastante eficaz para reduzir o número de larvas na matéria fecal e, como consequência, na pastagem. Assim, sob diferentes condições de estudo, a eficácia de *D. flagrans* na redução de larvas na pastagem observada por GRØNVOLD et al. (1993), foi de 74-85% em bovinos. Já BIRD & HERD (1995) demonstraram 83% de eficácia do fungo em bovinos, ovinos e eqüinos e FERNÁNDEZ et al. (1999c) apresentaram resultados de 55-64% e 78-94% em bovinos com 2 isolados diferentes do fungo *D. flagrans*. A recuperação de larvas na pastagem obteve um percentual de redução de 77,05% ao final do experimento, como demonstrado na Figura 3, sendo este resultado significativo ($P < 0,01$) entre os grupos no teste de Duncan. Por outro lado, no 4º e 5º mês de estudo (novembro e dezembro), o percentual de redução caiu, ou seja, o número de larvas recuperadas na pastagem aumentou em ambos os grupos, conforme se observa na Figura 3, provavelmente pelo aumento do índice pluviométrico neste período (Figura 4). *D. flagrans* se desenvolve melhor entre 20 a 25°C e um índice pluviométrico entre 15 e 60mm por semana conforme GRØNVOLD et al. (1996b). Além disso, segundo DIMANDER et al. (2003b), com o aumento das chuvas sobre os bolos fecais recém eliminados no campo ocorre uma rápida desintegração do esterco e, portanto, a separação física entre os esporos fúngicos e os estágios larvais pré-parasíticos, não permitindo a ação do fungo. Mesmo com o aumento de recuperação de larvas na pastagem dos dois grupos, pode-se observar que o número de larvas do grupo A (tratado) manteve níveis semelhantes ao início do experimento, diferente do grupo

B (controle) que atingiu seu nível máximo triplicando o número de larvas no mês de novembro, contrariando o estudo de DIMANDER et al. (2003b) que com chuvas em excesso não observou diferença entre o grupo tratado e o controle. Da mesma forma, EYSKER et al. (2005) obtiveram resultados pouco promissores na redução de larvas na pastagem em períodos de seca utilizando uma dosagem de 5×10^5 clamidósporos/kg de peso animal.

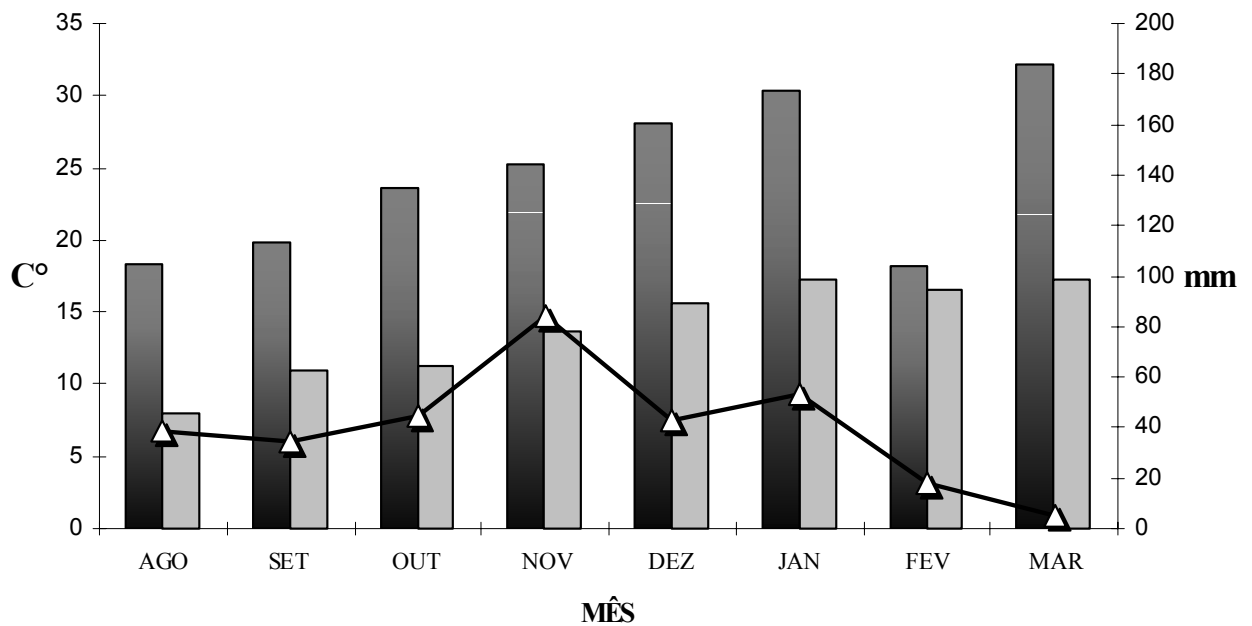
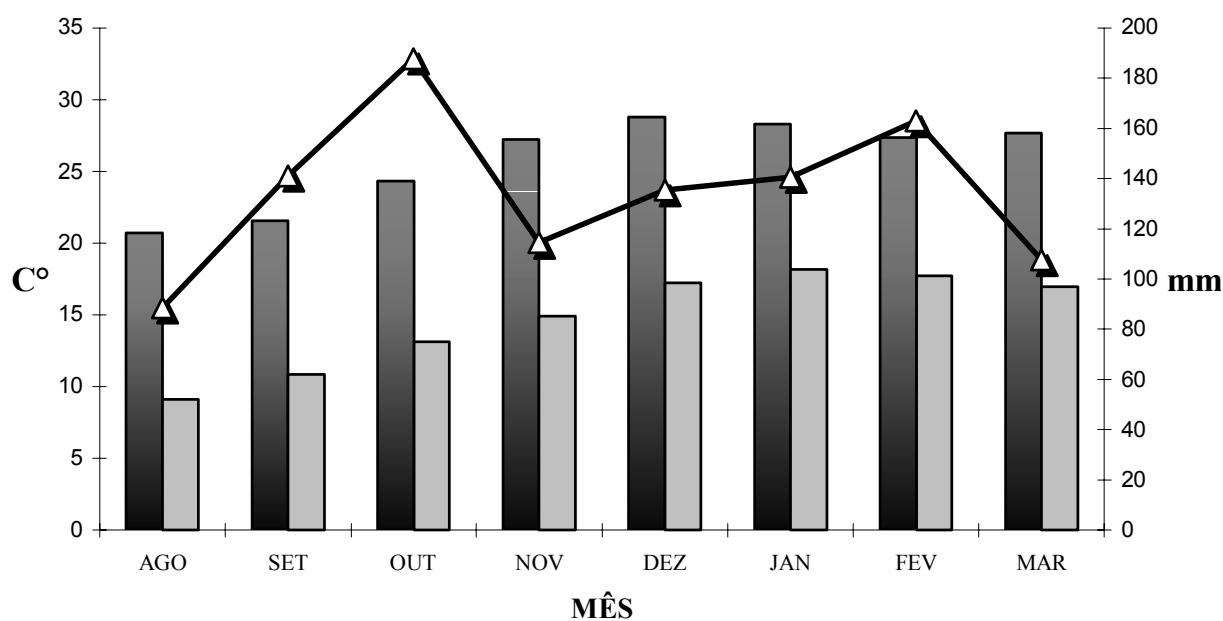


Figura 4 - Temperatura máxima nas colunas escuras, temperatura mínima nas colunas claras e o índice pluviométrico na linha contínua, durante o período de oito meses, na região de Júlio de Castilhos (RS).

Diferente do que foi encontrado por esses autores, no presente estudo ocorreu um período de estiagem de dezembro a março se comparada a série histórica do mesmo período (Figura 5), e, mesmo assim, atingiu bons resultados. Neste caso, a dosagem do fungo sugere relação com as condições climáticas. Por esse motivo, é adequada a suspensão da oferta do fungo aos animais, até que o intenso período de chuvas diminua e logo seja reiniciada a administração, sob pena de estar administrando desnecessariamente o produto.



FONTE: Estação de Júlio de Castilhos da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/FEPAGRO (Comunicação Pessoal)

Figura 5 - Série histórica de temperatura máxima nas colunas escuras, temperatura mínima nas colunas claras e o índice pluviométrico na linha contínua, dos meses de agosto a março, no período de 1994 a 2003, na região de Júlio de Castilhos (RS).

A média de peso dos animais entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ($P > 0,67$). Contudo numericamente, ao final do experimento, o grupo A (tratado) teve um incremento médio de 11,5 Kg a mais que o grupo B (Figura 6). O quadro de estiagem nos últimos 3 meses de estudo, pode ter afetado neste resultado, devido à baixa disponibilidade de alimento. Em um estudo realizado por DIMANDER et al. (2003a) em bovinos, não houve diferença de peso entre grupo tratado com *D. flagrans* e o controle, mas observou-se significativa diferença entre o grupo tratado com ivermectina e o controle ($P < 0,0001$) que aumentou em média 38Kg. Até o momento, não há relato de que o fungo influencie no ganho de peso de bovinos, de forma direta e significativa. Contudo, CHANDRAWATHANI et al. (2004) obtiveram um resultado significativo ($P = 0,054$) no peso de ovinos com a administração de *D. flagrans*. Pode-se deduzir também que o parasitismo mensurado pelo OPG não influenciou no ganho de peso dos animais, da mesma forma como os resultados encontrados por NICOLAU et al. (2002) em que os coeficientes de correlação entre ganho de peso e contagem de OPG foram próximos a zero. Entretanto, tais achados divergem das correlações negativas e significativas observadas por PLOEGER & KLOOSTERMAN (1993) em novilhas de raças leiteiras, e por O'KELLY et al. (1988) em novilhas de corte.

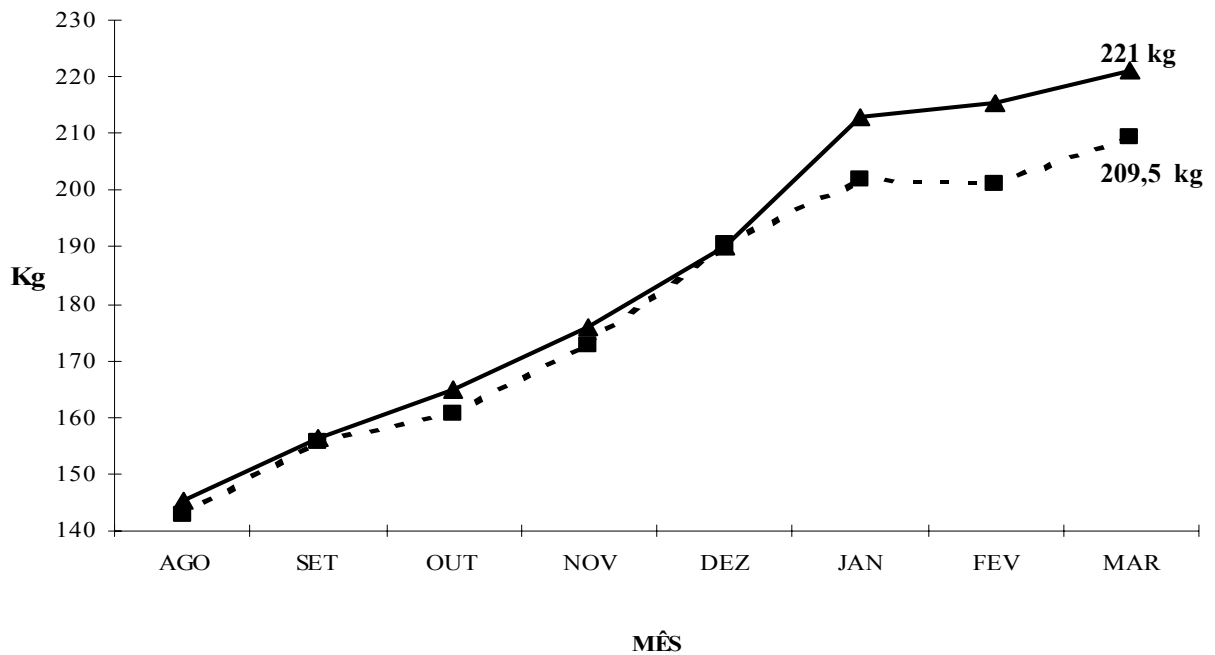


Figura 6 – Evolução da média do peso dos animais (Kg) entre o grupo tratado (A) em linha contínua e o grupo controle (B) em linha interrompida, no período de oito meses de experimento, não obteve diferença significativa pelo teste de Duncan ($P>0,67$).

Na análise de sangue (Tabela 2), realizada através da análise de variância, utilizando delineamento em medidas repetidas, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, verificou-se não haver interação significativa entre grupo e mês. Quanto aos efeitos principais, somente mês foi significativo, ou seja, independente do grupo, os meses de agosto, dezembro e janeiro apresentaram as menores médias de hematócrito não diferindo entre si, mas sendo significativamente menores do que os meses de setembro, outubro e novembro. Para todos os meses, não houve diferenças entre os grupos. Mesmo com os resultados de hematócrito demonstrados, não foi possível estabelecer uma correlação negativa com o número de ovos encontrados nas fezes dos animais ($P>0,62$). Estes achados diferem dos encontrados por MORALES et al. (2001) em que os valores do hematócrito dos animais estudados foram influenciados pelo nível de infecção parasitária, correspondendo os valores mais elevados de hematócrito aos animais negativos ou com infecções leves. Segundo MORALES et al. (1996), esta correlação negativa entre a carga parasitária e o valor do hematócrito tem sido vinculado à presença de parasito hematófago como o do gênero *Haemonchus*, nos animais. Entretanto no presente estudo, não foi encontrada esta correlação ainda que um dos principais parasitas encontrados tenham sido os do gênero *Haemonchus* (Tabela 1). É possível que esta correlação negativa não tenha sido observada devido ao curto período de tempo que os animais encontravam-se parasitados, pois

conforme GENNARI et al. (1991) a maior consequência do parasitismo é o caráter crônico da infecção.

Tabela 2: Análise de Variância, utilizando delineamento em medidas repetidas, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, entre o percentual de Hematócrito dos grupos A (tratado) e B (controle), no período de 6 meses.

Mês	Grupo				Total	
	A (Tratado)		B (Controle)		Média	Desvio Padrão
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
Agosto	31,90	5,86	32,40	3,57	32,15 ^b	4,73
Setembro	35,30	4,97	35,50	3,03	35,40 ^a	4,01
Outubro	38,78	3,15	35,90	3,25	37,26 ^a	3,45
Novembro	36,20	4,61	34,60	2,07	35,40 ^a	3,57
Dezembro	32,00	4,40	31,80	3,46	31,90 ^b	3,85
Janeiro	30,40	3,57	30,00	3,06	30,20 ^b	3,24
Total	34,02	5,21	33,37	3,67	33,69 ^b	4,49

“a” e “b”: letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o fungo *Duddingtonia flagrans* tem capacidade nematofágica significativa em bovinos jovens alimentados com pastagem nativa e suplementação com ração de manutenção, em uma carga animal no campo que iniciou com 0,8 unidade animal/hectare e terminou com 1,2 unidade animal/hectare, principalmente em relação à redução de larvas na pastagem.

Portanto, mesmo em condições climáticas adversas, como a seca ocorrida no Rio Grande do Sul no período de dezembro a março de 2004/2005 e o excesso de chuvas em outubro de 2005, houve uma redução significativa de larvas na pastagem e conseqüentemente do OPG dos animais, o que permite afirmar que o emprego deste fungo na produção extensiva de bovinos é eficaz como uma ferramenta de controle biológico de nematódeos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P. H. et al. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p.568-573, 2003.
- ARAÚJO, J. V. et al. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p.521-526, 1992
- ARAÚJO, J. V. et al. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal of Helminthology**, v.67, n.3, p.136-138, 1993.
- ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Veterinarski Arhiv**, v.69, n.2, p.69-78, 1999.
- ARAÚJO, J. V. et al. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (*Nematoda: Trichostrongyloidea*) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p.65-71, 2004.
- BANDINELLI, D. G. et al. Composição florística de pastagem natural afetada por fontes de fósforo, calagem e introdução de espécies forrageiras de estação fria. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.1, p.84-91, 2005.
- BARRON, G. L. The Nematode-destroying Fungi. **Canadian Biological Publications**, Gelfh, Canada, 140p., 1977.
- BIRD, J., HERD, R. P. The effect of nematophagous fungi fed to cattle, sheep and horses on the development of infective larvae. In: 15 Conference International WAAVP, 1995, Yokohama, Japan. **Anais...** Yokohama, p.151, 1995.

CANNING, E. U. Protozoal parasites as agents for biological control of plant-parasitic nematodes. **Nematologica**, v.19, p.342-348, 1973.

CHANDRAWATHANI, P. et al. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.3, p.177-187, 2004.

CHARLES, T. P. Verminoses dos bovinos de leite. In: Charles, T.P. & Furlong, J. (Eds). **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil. p.55-110, 1992.

COOKE, R. C.;GODFREY, B.E. S. A key of nematode-destroying fungi. **Transactions of British Mycology Society**, v.47, n.1, p.61-74, 1964.

CPTEC. Plataforma de coleta de dados meteorológicos, hidrológicos e ambientais. Capturado em 06 de maio de 2005. Online. Disponível na Internet: <http://canaleta.cptec.inpe.br:8080/BDPCD/passo2.jsp>

DIMANDER, S. O. et al. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 193-209, 2003a.

DIMANDER, S. O. et al. Seasonal translation of infective larvae of gastrointestinal nematodes of cattle and the effect of *Duddingtonia flagrans*: a 3-year plot study. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 99-116, 2003b.

EDMONSON, A.J. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

EMERY, D. L.; WAGLAND, B. M. Vaccines against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. **Parasitology Today**, v.7, p.347-349, 1991.

EYSKER, M. et al. Consequences of the unusually warm and dry summer of 2003 in the Netherlands: Poor development of free living stages, normal survival of infective larvae and long survival of adult gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.133, p.313-321, 2005.

FAEDO, M. et al. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding faeces deposited by cattle or sheep fed the fungus as a means of controlling the free-living stages of nematode parasites. **Biological Control**, v. 23, p. 64-70, 2002.

FAO. **Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina**. Salud Animal. Roma: FAO, 2003, 53p.

FERNÁNDEZ, A. S. et al. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing under different stocking rates. **Parasitology**, v. 119, p. 105-111, 1999a.

FERNÁNDEZ, A. S. et al. Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. **Parasitology Research**, v.85, p.661-668, 1999b.

FERNÁNDEZ, A. S. et al. The efficacy of two isolates of the nematode –trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p.289-304, 1999c.

GARCIA, A. M. **Avaliação da sobrevivência dos fungos nematófagos *Arthrobotrys musiformis* e *Duddingtonia flagrans* na incorporação e armazenamento em suplementos alimentares de ruminantes.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2000, 195p.

GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A.; DAVIES, C. J. Genetic control of immunity to gastrointestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.37, p.257-272, 1990.

GENNARI, S. M. et al. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.163-172, 1991.

GILL, H. S. & LE JAMBRE, L. F. Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.26, p. 915-925, 1996.

GOMES, A. S.; ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. C. F. Differential *in vitro* phatogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, v.32, n.1, p.79-83, 1999.

GORDON, H. L. & WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.** v. 12, p. 50-52, 1939.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with special reference to their ecology. **Biology Revision**, v.62, p.245-307, 1987.

GRØNVOLD, J. et al. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v.64, p.47-64, 1996a.

GRØNVOLD, J. et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v. 70, p. 291-297, 1996b.

GRØNVOLD, J. et al. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. **Helminthology**, v.67, p. 31-36, 1993c.

IGLESIAS, L. E. **Colonização de bolos fecais de bovinos tratados com ivermectin durante a época seca em condições simuladas de campo.** 1998. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 1998.

JANSSON, H. B. & NORDBRING-HERTZ. Infections events in the fungus-nematode system. In: POINAR O. G. & BORNE J. H. (ed.) **Diseases of Nematodes**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.59-62, 1988.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v.20, n.10, p. 477-481, 2004.

LARSEN, M. Biological control of helminthes. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

LARSEN, M. et al. Biological control of trichostrongylus in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M. et al. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v. 65, p. 193-200, 1991.

LARSEN, M. et al. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 66, p. 137-141, 1992.

LEHMAN, P. S. & REID, J.W. *Phyllognathopus viguieri* (Crustácea: Harpacticoida), a predaceous copepod of phytoparasitic, entomophagogenic and free-living nematodes. **Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.**, v. 52, p-78-82, 1993.

LIMA, W. S. **Dinâmica das populações de nematóides parasitas gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasita-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG, Brasil**. 1989. 179f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MACRAE, J. C. & MENDONZA DE GIVENS, P. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proc. Nutr. Soc.**, v.52, p.155-158, 1993.

MOLENTO, M. B. Técnica de contagem de larvas no pasto como ferramenta para diagnóstico parasitológico. IN: 2º Simpósio da Rede de Helminologia para América Latina e Caribe. **Anais...** Buenos Aires, Argentina, 2001, CD room.

MORALES, G. et al. Dinámica de los niveles de infección por estrongilidos digestivos en bovinos a pastoreo. **Parasitología al día**, v.25, n.3-4, 124-129, 2001.

MORALES, G. et al. Carga y asociaciones parasitarias: su efecto sobre el número de huevos en bovinos naturalmente parasitados. **Veterinaria Tropical**, v.21, p.145-154, 1996.

MOTA, M. A. et al. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

NANSEN, P. et al. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.325-335, 1988.

NANSEN, P. et al. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.81, p. 371-374, 1995.

NICOLAU, C. V. J. et al. Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais de bovinos Nelore em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4, p.212-220,2002.

O'KELLY, J. C.; POST, T. B.; BRYAN, R. P. The influence of parasitic infestations on metabolism, puberty and first mating performance of heifers grazing in a tropical area. **Animal Reproduction Science**, v.16, p.177-189, 1988.

PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: Padilha, T. (Ed.). **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, p.77-93, 1996.

PEÑA, M. T. et al. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.259-265, 2000.

PLOEGER, H.W.; KLOOSTERMAN, A. Gastrointestinal nematode infections and weight gain in dairy replacement stock: first-year calves. **Veterinary Parasitology**, v.46, p.223-241, 1993.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p.515-523, 1990.

ROBERTS, F. H. S. & O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Agricultural Research**, v.1, 1950, 99p.

SANTOS C. P. **Isolamento, identificação, produção massal de fungos nematófagos e avaliação das características biológicas do fungo *Duddingtonia flagrans***. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000, 101p.

SARKUNAS, M. et al. Biological control of trichostrongyle infections in calves on pasture in Lithuania using *Duddingtonia flagrans*, a nematode-trapping fungus. **Journal of Helminthology**, v.72, p.355-359, 2000.

SAUMELL, C. A. **Colonização de bolos fecais bovinos e fezes ovinas por fungos nematófagos e sua ocorrência em fezes frescas bovinas na Zona da Mata de Minas Gerais**. Ph.D. Tesis, Belo Horizonte, Brasil, 1998,175p.

SAUMELL, C. A. et al. Nematophagous fungi in fresh faeces of cattle in the Mata Region of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.217-220, 1999.

SAUMELL, C. A. & FERNÁNDEZ, A. S. Hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos parásitos de rumiantes. **Revista Medica Veterinaria**, v. 81, p. 270-273, 2000.

STIRLING, G. R. Host specificity of *Pausteria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. **Nematologica**, v.1, p. 203-209, 1985.

STRONG, I. et al. The effect of faecally excreted ivermectin and febendazole on the insect colonization of cattle dung following the oral administration of sustained release boluses. **Veterinary Parasitology**. v. 62, p. 253-266, 1996.

TERRILL, T.H. et al. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p.285-296, 2004.

UENO, H. & GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Japan International Cooperation Agency, 4 ed. Tokyo, Japan, 1998. 134p.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

VEENHUIS, M. et al. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. **Antonic Van Leeuwenhoek**, v.51, p.385-398, 1985

WAGHORN, T. S. et al. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastro-intestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 227-234, 2003.

WALLER, P. J. Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. In: Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi, **19 FAO Animal Production and Health**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p.11-14, 1998.1998

WILDMAN, E.E. et al. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WOLSTRUP, J. et al. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **Journal of Helminthology**, v. 68, p. 175-180, 1994.

WRIGHT, R. W., et al. The effect of *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of Saanen goats on pasture. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 61-69, 2003.