

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AÇÃO DO
FUNGO *Duddingtonia flagrans* UTILIZADO COMO
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Haemonchus contortus*
EM OVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Buske

Santa Maria, RS, Brasil

2010

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AÇÃO DO FUNGO
***Duddingtonia flagrans* UTILIZADO COMO CONTROLE**
BIOLÓGICO DE *Haemonchus contortus*
EM OVINOS

por

Rodrigo Buske

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

Orientador: Prof. Mario Luiz de La Rue

Santa Maria, RS, Brasil

2010

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Rodrigo Buske. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Dr. Bozano, nº. 103/ 302, Centro, Santa Maria, RS, 97115-001

Fone (0xx)55 81292774; End. Eletr: robuske@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AÇÃO DO FUNGO
Duddingtonia flagrans UTILIZADO COMO CONTROLE BIOLÓGICO
DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS**

elaborada por
Rodrigo Buske

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mario Luiz de La Rue, Dr.
(Presidente/Orientador)

Luis Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)

Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de maio de 2010.

À MINHA FAMÍLIA PELO APOIO
INCONDICIONAL E, PRINCIPALMENTE, PELO APOIO
QUANDO DECIDI DEIXAR A VIDA INTERIORANA PARA ESTUDAR

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, PELA OPORTUNIDADE DE FORMAÇÃO E PELA ESTRUTURA DISPONIBILIZADA.

AO PROFESSOR MÁRIO LUIZ DE LA RUE, PELA ORIENTAÇÃO, CONSELHOS, OPORTUNIDADE, CONVERSAS SOBRE OS MAIS VARIADOS ASSUNTOS E, SOBRETUDO, PELA AMIZADE.

AO VILSON, PELA AJUDA PRECIOSA DURANTE A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.

À LILIAN, PELA AJUDA INICIAL NOS “CONHECIMENTOS VETERINÁRIOS”.

À SILVIA, À LIZIANE E À CLARISSA, PELA AJUDA E POR SUPORTAREM AS CORRERIAS E AS INTEMPÉRIES DO EXPERIMENTO JUNTO COMIGO.

AOS PROFESSORES DE ESTATÍSTICA DA UFSM, JOSÉ HENRIQUE SOUZA DA SILVA, LUIS FELIPE DIAS LOPES E AO PROFESSOR BERNARDO BALDISSEROTTO, PELA VALIOSA AJUDA NA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TRABALHO.

AO ALEKSANDRO E AO RÉGIS, PELAS CONVERSAS DE CORREDOR E CONSELHOS ÚTEIS.

AO PROFESSOR JÂNIO MORAIS SANTURIO, PELO FORNECIMENTO DE MATERIAL PARA EXECUÇÃO DO TRABALHO.

AOS MEUS PAIS, POR COMPREENDEREM MINHA AUSÊNCIA QUANDO MINHA PRESENÇA ERA NECESSÁRIA E, PRINCIPALMENTE, POR SEREM MEU PORTO SEGURO.

À FRANCIS, PELO APOIO DIÁRIO, PELAS PALAVRAS DE CARINHO E PELA COMPREENSÃO NESTES ÚLTIMOS DOIS ANOS.

À COMUNIDADE EDUCATIVA DO COLÉGIO MARISTA SANTA MARIA, PRINCIPALMENTE AOS MEUS ALUNOS, POR COMPREENDEREM MINHAS AUSÊNCIAS, FALHAS E MUDANÇAS DE HUMOR.

AOS MEUS AMIGOS, PELO APOIO DIÁRIO E, PRINCIPALMENTE, PELA AMIZADE CONSTANTE E QUE MOTIVA.

ÀS PESSOAS QUE, DE ALGUMA FORMA, AUXILIARAM NA REALIZAÇÃO DESSE TRABALHO E, NO MOMENTO, SEUS NOMES NÃO ME VIERAM À MENTE.

“QUANTAS CAMINHOS UM HOMEM DEVE PERCORRER
ATÉ PODER SER CHAMADO DE HOMEM?
E QUANTOS OCEANOS UMA GAIVOTA DEVE SOBREVOAR
ANTES DE PODER DORMIR NA AREIA?
E QUANTAS VEZES AS BALAS DE CANHÃO DEVEM VOAR
ANTES DE SEREM BANIDAS PRA SEMPRE?
A RESPOSTA, MEU AMIGO, ESTÁ VOANDO COM O VENTO
A RESPOSTA ESTÁ VOANDO COM O VENTO

E POR QUANTOS ANOS UMA MONTANHA PODE EXISTIR
ANTES DE SER LAVADA PELOS OCEANOS?
E POR QUANTOS ANOS ALGUMAS PESSOAS DEVEM EXISTIR
ANTES DE PODEREM SER LIVRES?
E QUANTAS VEZES UM HOMEM PODE VIRAR A CABEÇA
FINGINDO QUE ELE NÃO VÊ?
A RESPOSTA, MEU AMIGO, ESTÁ VOANDO COM O VENTO
A RESPOSTA ESTÁ VOANDO COM O VENTO

E QUANTAS VEZES UM HOMEM DEVE OLHAR PRA CIMA
ANTES DE CONSEGUIR VER O CÉU?
E QUANTOS OUVIDOS UM HOMEM DEVE TER
PARA PODER CONSEGUIR OUVIR AS PESSOAS CHORAREM?
E QUANTAS MORTES SERÃO NECESSÁRIAS ATÉ ELE SABER
QUE PESSOAS DEMAIS JÁ MORRERAM?
A RESPOSTA, MEU AMIGO, ESTÁ VOANDO COM O VENTO
A RESPOSTA ESTÁ VOANDO COM O VENTO.”

BLOWIN' IN THE WIND

BOB DYLAN

RESUMO

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

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AÇÃO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* UTILIZADO COMO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS

AUTOR: RODRIGO BUSKE

ORIENTADOR: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de maio de 2010.

Nos últimos anos vem crescendo a busca por métodos alternativos para o combate a parasitas gastrintestinais e, nesse contexto, o controle biológico realizado pelo fungo *Duddingtonia flagrans* destaca-se. Neste trabalho, analisamos a possibilidade de a temperatura influenciar a atividade nematofágica de *D. flagrans* contra o parasita de ovinos *Haemonchus contortus*. Utilizou-se 04 ovelhas, sendo duas parasitadas com *H. contortus* e duas isentas de parasitas. Uma das ovelhas desparasitadas recebeu, durante 03 dias consecutivos, antes da coleta, 1×10^6 clamidósporos de *D. flagrans*, liofilizados, em cápsulas gelatinosas. Após coleta das fezes com auxílio de sacos coletores, as fezes foram misturadas, resultando amostras com fungo e sem fungo (controle). Cada amostra foi incubada em sete diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C), durante 21 dias. Após foi realizada a recuperação e contagem larval. A melhor temperatura para ação do fungo foi a de 30°C. Não foram recuperadas larvas na temperatura de 5 °C. A partir da temperatura de 10 °C, a ação do fungo foi detectada, porém não houve diferença significativa na percentagem de redução larval entre as temperaturas, significando que a presença de larvas parece ser o principal fator a influenciar sua ação nematofágica. Pode-se concluir que a temperatura não parece ser um fator limitante no controle biológico de *Haemonchus contortus* de ovinos realizado pelo fungo *Duddingtonia flagrans*. Mesmo em temperaturas mais baixas, o liofilizado de *D. flagrans* reduziu o número de larvas *H. contortus* demonstrando, mais uma vez, a potencialidade dessa espécie no controle biológico, mesmo em condições não ideais para o seu desenvolvimento e das larvas, podendo ser utilizado em climas mais amenos, como no Estado do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, temperatura, controle biológico

ABSTRACT

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON BIOLOGICAL CONTROL ACTIVITY OF THE FUNGUS *Duddingtonia flagrans* AGAINST *Haemonchus contortus* IN SHEEP

In recent years has increased the search for alternative methods to combat gastrointestinal parasites, and in this context, biological control achieved by the fungus *Duddingtonia flagrans* draws attention. In this study, we analyze the possibility of the temperature have influence on the nematophagic activity of *D. flagrans* against the parasites *Haemonchus contortus* of sheep. We used four sheep, two parasitized with *H. contortus* and two dewormed. One dewormed sheep received, for three consecutive days before collection of feces, 1×10^6 chlamydospores of *D. flagrans*, lyophilized, in gelatin capsules. After feces collection, with the aid of collectors bags, they were mixed, resulting in samples with (fungus) and without fungus (control). Each sample was incubated at seven different temperatures (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 ° C) for 21 days. After the incubation period recovery and counting of larvae was performed. The best temperature for fungus action was 30 ° C. No larvae were recovered at 5 °C. From 10 °C, the fungus action was detected, but there was no significant difference in the percentage of larval reduction between the temperatures, demonstrating that the presence of larvae seems to be the main factor affecting its nematophagic action. It can be concluded that the temperature does not seem to be a limiting factor in the action of *Duddingtonia flagrans* used for biological control of *Haemonchus contortus*. Even at lower temperatures, the lyophilized *D. flagrans* reduced the number of *H. contortus* larvae, showing, once again, the potentiality of this species in biological control, even in non-ideal conditions for their development and the larvae development, so that it can be used in colder climates, as in Rio Grande do Sul state.

Keywords: *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, temperature, biological control

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Mean Number of Larvae Recovered (MNLr) at each temperature and the corresponding percentage reduction (action of the fungus).....	46
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Amount of larvae recovered at each temperature (°C) in the <i>D. flagrans</i> and control samples.....	47
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Haemonchus contortus</i>	17
2.2 Controle Biológico	19
2.3 Fungos Nematófagos	22
2.4 <i>Duddingtonia flagrans</i>	24
3. MANUSCRITO	28
Influence of temperature on biological control activity of the fungus <i>Duddingtonia flagrans</i> against <i>Haemonchus contortus</i> in sheep	29
Abstract	30
1 Introduction	31
2 Materials and methods	32
2.1 Samples preparation and lyophilized <i>D. flagrans</i> production	32
2.2 Characterization of animals	33
2.3 Experimental Design	33
2.4 Statistical Analysis	35
3. Results	35
3.1 EPG and CPG of the <i>D. flagrans</i> and control samples	35
3.2 Influence of temperature on <i>D. flagrans</i> nematophagous activity	36
3.3 Influence of temperature in larvae recovery	36
4. Discussion	36
5. References	39
4. BIBLIOGRAFIA	48

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Confederação Nacional da Agricultura (CNA), o PIB do agronegócio movimenta 27% da economia brasileira. Especificamente falando da pecuária, a região Sul reúne cerca de 18% dos bovinos e mais de 60% dos ovinos criados no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul o primeiro produtor brasileiro de ovinos (IBGE, 2006). A pecuária intensiva também é bastante desenvolvida na região Sul, que detém o segundo ranking na produção brasileira de leite. Assim, cuidados com a qualidade e organização do setor pecuarista são imprescindíveis.

Entre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, o parasitismo gastrointestinal ocupa um lugar de destaque (MACRAE, 1993). Os parasitas gastrointestinais causam doenças e podem matar, mas talvez o seu principal impacto econômico é na redução do crescimento dos jovens cordeiros (COOP et al., 1977). A severidade da doença e a perda de produção dependem da intensidade da infecção, imunidade do hospedeiro e de seu *status* nutricional (COOP & KYRIAZAKIS, 2001; STEAR et al., 2003). O conhecimento sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos, viabilidade larval 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 são desconsideradas, 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).

Diversos programas de controle vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos das endoparasitoses. Entre eles, os que têm focado 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; MOTA et al., 2003).

O termo controle biológico se aplica à 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 estudado como alternativa de controle biológico dos nematódeos de ruminantes (WALLER, 1998; SAUMELL & FERNÁNDEZ, 2000).

Esses fungos destruidores de nematóides estão catalogados em mais de 150 espécies (BARRON, 1977). A maioria dos fungos nematófagos eram classificados na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzindo-se agamicamente por esporos exógenos que são formados sobre ramificações do micélio (DRECHSLER, 1937). Até 1964, a maioria dos fungos era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyella* e *Trichothecium*. Posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (GRAY, 1987). Há duas décadas, estágios de reprodução sexuada destes fungos foram observados para algumas espécies que estão sendo reconhecidas como pertencentes ao filo Ascomycota (GRIFFIN, 1994). Eles produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. O aprisionamento na armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide. Dentro do nematóide, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos (MORGAN-JONES & RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1988).

Os fungos desenvolvem sua ação sobre os parasitas da seguinte maneira: uma vez que ele e as larvas dos parasitas se encontram nas fezes dos animais, ocorre seu crescimento e começa o desenvolvimento do sistema hifal na forma de rede. Como as larvas apresentam grande motilidade, terminam fixadas na rede e sendo uma fonte de nutrição para o fungo. Como consequência, o número de larvas na matéria fecal se reduz e, portanto, também diminui a quantidade de larvas infectantes no pasto.

Atualmente, *Duddingtonia flagrans* tem se estabelecido como o candidato ideal. A razão para isto é que, por ser um predador altamente eficiente devido à formação de redes tridimensionais, ele produz abundante quantidade de esporos de resistência (clamidósporos) que suportam a passagem através do trato gastrintestinal dos animais (LARSEN et al., 1991 e LARSEN et al., 1992). Isto permite que o fungo possa ser dosado e administrado aos animais, para logo aparecer nas fezes e ali exercer sua ação predadora sobre as larvas dos parasitas. Apesar disso, os trabalhos realizados a campo para estudar os efeitos dos fungos nematófagos contra parasitas de ruminantes sob condições naturais são relativamente escassos.

As temperaturas médias anuais do Rio Grande do Sul ao longo do ano são inferiores a 20°C, já o regime de chuvas é caracterizado por índices que superam a marca dos 1500 mm anuais. Por outro lado, as temperaturas oscilam em poucos dias entre 10 e 25°C, bem como os índices pluviométricos previstos para um (01) mês, podem ser distribuídos em alguns dias. (ATLAS SOCIOECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL, 2008). GRØNVOLD et al. (1996b) percebeu que *D. flagrans* se desenvolve melhor entre 20 a 25°C e um índice pluviométrico entre 15 e 60 mm por semana. Isto pode significar que a temperatura e a umidade também influenciam a atividade predatória deste fungo nematófago.

Ainda, nos últimos anos têm aumentado a demanda por produtos agropecuários “limpos” ou “orgânicos”, isto é, produtos criados e/ou cultivados com ausência ou baixo uso de substâncias químicas. Esse tipo de produto agropecuário surgiu devido à publicidade negativa, inferindo que essas substâncias poderiam ter efeitos nocivos sobre a saúde humana e/ou desenvolver resistência em patógenos, que já foi detectada há algumas décadas (PRICHARD, 1990), bem como resíduos de drogas nos alimentos (PADILHA, 1996) e sua ação em organismos não alvo (BIRD & HERD, 1995; IGLESIAS, 1998).

Na Suécia, existe uma política governamental de estímulo à produção orgânica, onde se procura chegar ao nível de 20% dos produtos agropecuários (DIMANDER et al., 2003). Com isto, os padrões estabelecidos para a produção orgânica proíbem o uso profilático de drogas, incluindo aí os anti-helmínticos. Desta maneira, surgem duas opções para a criação de animais de carne: o manejo racional e o controle biológico.

No Brasil foi criada a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, demonstrando o aumento na importância do cultivo de produtos orgânicos e organizando este tipo de atividade no país.

No que diz respeito ao controle biológico de parasitas gastrintestinais de ruminantes, ainda há a necessidade de mais estudos que verifiquem a eficácia dessa forma de controle parasitário, principalmente os que analisam efeitos de variáveis ambientais, como a temperatura que, sabidamente, influencia a predação.

Assim, estudos sobre a influência das condições climáticas do Rio Grande do Sul na ação nematofágica de *D. flagrans* são necessários para termos parâmetros de utilização deste tipo de controle biológico para endoparasitas de ovinos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Haemonchus contortus*

O nematóide *Haemonchus contortus* é um parasita hematófago que habita o abomaso de ovinos e caprinos, sendo responsável por extensas perdas nesses animais, principalmente em regiões tropicais (FOREYT, 2005).

Este tricostrongilídeo é classificado taxonomicamente no Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* e Espécie *Haemonchus contortus* (Rudolf, 1803)

Existem várias espécies conhecidas pertencentes ao gênero *Haemonchus*, sendo as mais comuns *H. contortus*, *H. placei* e *H. similis* (URQUHART et al, 1998).

H. contortus é a espécie dominante em termos de intensidade de infecção em pequenos ruminantes (ACHI et al., 2003), pois estes animais mostram-se altamente susceptíveis, com alta taxa de estabelecimento da infecção e grande excreção de ovos pelas fêmeas (JACQUIET et al., 1998), em comparação com outras espécies de ruminantes.

O ciclo evolutivo de *H. contortus* é direto e a fase pré-parasitária é típica de tricostrongilídeos. Os ovos são eliminados nas fezes e em condições ideais (18 a 26°C e 80 a 100% umidade) se desenvolvem no pasto em terceiro estágio infectante (L3) em aproximadamente 5 dias. Em condições frias o desenvolvimento pode ser retardado por semanas ou meses. A temperatura ótima para a sobrevivência das larvas é de 18 a 26°C (ONYAH & ARSLAN, 2005). Em baixas temperaturas as larvas sobrevivem por longos períodos devido ao seu baixo metabolismo e reservas energéticas. A umidade é também um fator importante para a sobrevivência da larva, em condições secas, como no semi-árido brasileiro, as larvas não sobrevivem (AROSEMENA et al., 1999). A irrigação pode influenciar na disponibilidade de L3, sendo encontradas em grande número em pastagens irrigadas durante o verão com temperaturas em torno de 24°C (KRECEK et al., 1991). Após a ingestão e o desencapsulamento no rúmen, as larvas sofrem duas mudas. Exatamente antes da muda final eles desenvolvem a lanceta perfurante que lhes permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do parasita. Quando adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa. O período pré-patente é de duas a três semanas em ovinos e quatro semanas em bovinos (FOREYT, 2005).

A patogenia causada por *H. contortus* é essencialmente de uma anemia hemorrágica aguda, devido ao hábito hematófago do parasita (FETTERER & RHOADS, 1998), levando a

um severo comprometimento do animal e a grandes perdas econômicas (SANGSTER et al., 1999). Cada parasita remove cerca de 0,05 mL de sangue ao dia, tanto pela ingestão, como pela perda por lesões, de tal modo que um ovino com 5000 *H. contortus* pode perder cerca de 250 mL ao dia (URQUHART et al, 1998).

Na hemoncose aguda, a anemia torna-se evidente cerca de duas semanas após a infecção e se caracteriza pela diminuição dramática e progressiva do volume globular. À necropsia, podem estar presentes 2.000 a 20.000 parasitas na mucosa abomasal, que exibe numerosas pequenas lesões hemorrágicas. Menos comumente, em infecções maciças de até 30.000 parasitas, ovinos aparentemente saudáveis podem ter morte súbita por grave gastrite hemorrágica intensa, fenômeno conhecido como hemoncose hiperaguda.

Ainda, e não menos importante, pode desenvolver-se durante períodos de seca prolongada, quando a reinfecção é insignificante mas o pasto torna-se deficiente de nutrientes, a chamada hemoncose crônica. Nesse caso, a contínua perda de sangue por pequenas cargas persistentes de várias centenas de parasitas é suficiente para produzir sintomas clínicos associados principalmente a perda de peso, fraqueza e inapetência do que a anemia acentuada (BOWMAN, 2006).

O impacto da patogenia da hemoncose sobre o hospedeiro pode ainda ser afetado pela dieta oferecida aos animais, àqueles que têm dietas pobres em proteína, apresentam sinais clínicos mais pronunciados, apesar de apresentar carga parasitária semelhante àqueles que têm uma dieta rica em proteína (ABBOTT et al., 1986), portanto a doença pode ser intensificada devido à baixa qualidade alimentar dos animais (ALLONBY & URQUHART, 1975).

A distribuição de *H. contortus* é mundial, porém sua epidemiologia é diferenciada se compararmos regiões tropicais e subtropicais com regiões temperadas. Como o desenvolvimento larval do parasita ocorre de maneira ideal em temperaturas relativamente altas, a hemoncose é considerada uma doença de ovinos de clima quente. Contudo, a frequência e a gravidade dos surtos da doença dependem amplamente das chuvas, devido à necessidade de uma umidade relativamente alta (URQUHART et al, 1998).

Além das condições climáticas, o aparecimento da hemoncose clínica parece ser favorecido pelo elevado número de ovos liberados nas fezes pelas fêmeas e pela provável incapacidade dos hospedeiros desenvolverem imunidade adquirida eficaz contra o parasita, fazendo com que haja contaminação contínua do pasto (FOREYT, 2005).

Outro fator muito importante para a epidemiologia da hemonose é a capacidade das larvas de *H. contortus* possuírem fase histiotrófica, fenômeno no qual as larvas permanecem inibidas ao invés de amadurecerem sexualmente. Esse fenômeno ocorre devido às condições ambientais adversas e evita a produção de ovos que inevitavelmente não se desenvolveriam nas pastagens em tais condições. Assim, o acúmulo de larvas inibidas frequentemente coincide com o início das condições frias de outono/inverno em locais de clima temperado ou condições muito secas nos trópicos ou subtropicais (URQUHART et al., 1998).

No Brasil, vários levantamentos têm sido realizados a fim de determinar os nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos. Dentre os parasitas encontrados, o mais prevalente é *H. contortus*, seja na região nordeste (AROSEMENA et al., 1999; CHARLES, 1989; CHARLES, 1995; COSTA & VIEIRA, 1984; SILVA, et al., 2003), na região sudeste (AMARANTE, et al., 2004), na região sul (RAMOS et al., 2004) ou na região norte (BRAGA & GIRARDI, 1991). Além disso, *H. contortus* é o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em nematóides de pequenos ruminantes (SANGSTER, 2001), sendo o mais prevalente e de maior intensidade em populações parasitárias resistentes a anti-helmínticos em regiões do nordeste brasileiro (CHARLES et al., 1989; VIEIRA & CAVALCANTE, 1999), na região sul do Brasil (FARIAS et al., 1997) e na América Latina (WALLER et al., 1996).

2.2. Controle Biológico

Grønvold et al. (1996) definem o termo “controle biológico” como sendo a aplicação e utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente e que possam diminuir a um limiar aceitável determinada população de certo agente agressor que esteja causando perdas produtivas, tanto na pecuária como na agricultura. Na prática, o controle biológico não atuará sobre estágios internos dos parasitas; mas concentrarão suas ações sobre os hospedeiros intermediários paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais.

A administração de fungos nematófagos aos animais domésticos é considerada uma proposta promissora, pois o emprego desses fungos tem se apresentado como uma boa oportunidade de controle dos estágios de vida livre dos nematóides nas pastagens, reduzindo em grande parte as reinfestações e contribuindo para a sua profilaxia (BARGER, 1999; MOTA et al., 2003).

Segundo Freitas et al. (2006), os mecanismos de controle biológico são o parasitismo, a predação, a competição e a antibiose. Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda população é regulada por antagonistas. Este processo ocorre espontaneamente na natureza e não é dependente da interferência do homem. Suas vantagens incluem a fácil aplicação, boa dispersão ambiental, menor custo, efeito prolongado que poderá afetar populações subsequentes de parasitas, diminuição do aparecimento de resistência e associação com outras drogas sem deixarem resíduos ou causar toxicidade tanto nos animais quanto no ambiente.

Os requerimentos mais importantes para o estabelecimento de um sistema de controle efetivo das helmintoses gastrintestinais englobam, principalmente, o conhecimento da epidemiologia dos helmintos e suas interações com hospedeiros em um determinado ambiente. Contudo, na falta destas informações, poderá ocorrer utilização inadequada de tratamentos com anti-helmínticos causando aparecimento de resistência (ARAÚJO et al., 2004b). Os programas de controle parasitários eficientes devem estar baseados em informações sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos, viabilidade larval e no uso de drogas anti-helmínticas sintéticas.

Waller (2005) menciona que o controle das helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos é feito principalmente por meio da utilização de anti-helmínticos que agirão sobre as formas parasitárias estabelecidas no hospedeiro. Porém, este método apresenta algumas desvantagens como a presença de resíduos na carne e no leite, risco de impacto ambiental, além do desenvolvimento iminente de resistência de parasitas. Isso se deve ao seu uso continuado com múltiplas classes químicas que, na maioria das vezes, contribuem para que as pastagens estejam contaminadas por nematóides (WALLER & FAEDO, 1993; SUAREZ, 2002). Além disso, a seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitas gastrintestinais é uma proposta viável que se baseia na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais, atentando-se para o fato que as formulações ofereçam segurança para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente.

Segundo Gamarro e Castanys (1993), a resistência adquirida às classes químicas de anti-helmínticos é atualmente um dos problemas mais graves enfrentados no tratamento das

infecções helmínticas. Gárate et al. (1993) mencionam ainda que, devido à baixa mortalidade e à sua alta morbidade provocada pelas infecções helmínticas, o seu interesse no desenvolvimento de maiores pesquisas está focado apenas em seu controle e tratamento, apesar de sua grande prevalência. Além disso, a produção de vacinas continua sendo um objetivo a longo prazo, pois muitos são os fatores limitantes.

Dessa forma, os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade enfatizam sempre a necessidade da implantação de programas integrados de controle parasitário, que visem assegurar a saúde dos organismos vivos e ambientes menos contaminados (MOTA et al., 2003). A maioria dos estudos sobre controle biológico das helmintoses tem envolvido apenas utilização de fungos nematófagos predadores sobre larvas infectantes (L3) de helmintos parasitos gastrintestinais. Todavia, o controle biológico sobre ovos de helmintos é uma alternativa muito promissora e que vem se destacando atualmente. Além disso, fungos que impedem a evolução de ovos provavelmente são mais promissores como agentes de biocontrole, pois quando comparados aos fungos predadores e endoparasitas, seu efeito na redução de uma população de helmintos será bem mais acentuado (WALLER et al., 1994; MENDOZA-DE-GIVES et al., 1999).

A resistência à passagem pelo trato gastrintestinal é uma característica importante em fungos nematófagos, quando se deseja o desenvolvimento de formulações de uso oral que permitam o controle de L3 no ambiente (ARAÚJO et al., 1999). Segundo Kerry (2000), algumas espécies produzem clamidósporos e, portanto, poderiam ser empregados no controle das populações de helmintos parasitas gastrintestinais.

A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (PEARSSON et al., 1995). O sucesso para o estabelecimento desses fungos no solo dependerá basicamente de uma fonte alimentar que possa lhes garantir vantagens competitivas na microbiota existente (KERRY et al., 1984). Esses fungos são bastante comuns em solos naturais e em todo o tipo de material orgânico. Porém, sua atividade e quantidade no solo algumas vezes são incertas, já que necessitam de uma fonte primária de nutrição (JAFFEE et al., 1996).

Segundo Faedo et al. (2002b), para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e ambiente ao mesmo tempo que as formas pré-parasitárias dos helmintos. Por outro lado, a baixa competitividade com fungos saprófitos no ambiente e a pequena produção de armadilhas são alguns fatores atribuídos como parte do insucesso de seu emprego. O fungo será mais promissor em solo

fértil do quem em fezes frescas (JUNIPER, 1957). Por isso é necessária uma seleção de fungos nematófagos que possam atravessar o trato gastrointestinal dos animais, mantendo suas qualidades de crescimento e predação nas fezes (GRØNVOLD et al., 1996).

A aplicação de fungos no biocontrole de helmintos parasitos gastrintestinais vem auxiliar o controle químico. Ela deveria ser feita não só em condições previstas para maior infestação das pastagens, mas também quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente. Tais ações previnem o parasitismo clínico e a perda de produtividade, fornecendo uma quantidade de larvas suficientes aos animais para provocar o desenvolvimento de uma imunidade adquirida naturalmente (WALLER & FAEDO, 1993; GRAMINHA et al., 2004).

2.3. Fungos Nematófagos

O primeiro fungo nematófago a ser estudado foi o *Arthrobotrys oligospora*, por Frenesius, em 1852, que, por ventura, nessa época não percebeu sua capacidade predatória, o que somente foi proposto por Zopf em 1888. Pouco então se conhecia sobre esses fungos, até que em 1937 Drechsler publicou um extenso trabalho que continha informações bem detalhadas sobre algumas espécies que haviam sido descritas e mais 15 outras ainda desconhecidas (MOTA et al., 2003).

Os trabalhos de Duddington, de 1950 a 1972, e Barron a partir de 1969, contribuíram para que fosse iniciado o desenvolvimento na área de controle biológico de helmintos, referindo-se em especial ao isolamento e descrição de novas espécies (GRAY, 1988). A maioria das espécies de fungos descritas era antigamente classificada na classe Fungi imperfecti (com reprodução assexuada ou imperfeita), com divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomicetales e família Moliniaceae. Mais recentemente, estágios de reprodução sexuada, foram verificados em algumas espécies que estão sendo reclassificadas como pertencentes à classe Ascomycota (GRIFFIN, 1994; MOTA et al., 2003).

No Brasil, as primeiras pesquisas com fungos nematófagos foram iniciadas com o isolamento de algumas espécies a partir de helmintos infectados (ALCÂNTARA & AZEVEDO, 1981) e, a partir disso, muitos trabalhos comprovando sua ação como agentes de biocontrole sobre helmintos e fitonematóides foram realizados com sucesso. Em estudo *in vitro*, Freire e Bridge (1985) demonstraram a capacidade predatória de duas espécies de fungos nematóides ovicidas, *Paecilomyces incognita* e *Verticillium chlamydosporium* sobre

ovos de *Meloidogyne incognita*, um fitonematóide, com taxas de infecção em torno de 59,7 % e 43,7%, respectivamente.

Ferraz et al. (1992) e Maia e Ferraz (1993) deram prosseguimento a alguns levantamentos para a detecção de fungos nematófagos em solos brasileiros, encontrando *P. lilacinus*, conseguindo posteriormente o seu isolamento. No trabalho de Pria (1992), estudou-se o controle biológico de fungos nematófagos sobre fitonematóide, demonstrando a necessidade da combinação de isolados predadores e oportunistas. Santos et al. (1995) utilizando conídios de *A. oligospora* e *D. flagrans* reduziram o número de larvas de ciatostomídeos de equinos.

Araújo et al. (1992, 1993) desenvolveram trabalhos pioneiros no Brasil, utilizando fezes de animais domésticos, nas quais determinaram o efeito antagônico dos fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* sobre larvas de *Haemonchus placei*. Araújo (1996) administrou dois milhões de conídios de um isolado de *A. robusta*, por via oral, duas vezes por semana, durante quatro meses em bezerros naturalmente infectados, conseguindo resultados promissores na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) com índices de redução em torno de 53,81% e 70,45% de redução na recuperação de parasitas durante a necropsia dos animais.

A partir de então, em ensaios preliminares Araújo et al. (1998) testaram a viabilidade de um isolado de *A. robusta* em helmintos parasitos de bovinos, observando uma redução de 73,81% no OPG e 70,45% no número de parasitas recuperados na necropsia dos animais, nos últimos três meses de experimento.

Nos últimos anos, outros trabalhos utilizando fungos nematófagos foram realizados e os resultados ainda demonstram a viabilidade do controle biológico frente às helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos. Com o trabalho de Campos et al. (2004) foi verificada a capacidade predatória de fungos nematófagos do gênero *Monacrosporium* previamente submetidos a diferentes métodos de preservação, sobre larvas de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp., observando que sua capacidade predatória não foi afetada, possibilitando com isso um conhecimento sobre meios alternativos de preservação *in vitro*. Araújo et al. (2006b) testando a passagem do isolado fúngico *D. flagrans* em trato gastrintestinal de caprinos, observaram uma redução significativa no número de larvas recuperadas de *Strongyloides papillosus* e *H. contortus* após os tratamentos com esse isolado em relação aos animais do grupo controle.

2.4. *Duddingtonia flagrans*

O gênero *Duddingtonia* é caracterizado por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos (VAN OORSHOT, 1985). A presença do helminto induz à formação de armadilhas. Durante o processo de envelhecimento aumenta sua produção de clamidósporos. Estes conídios apresentam formato que pode variar de elíptico a ovóide com septo mediano (MOTA et al., 2003). *D. flagrans* é a espécie de fungo mais promissora empregada no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos (LARSEN, 1999), realiza predação de helmintos por meio de uma rede tridimensional de hifas adesivas e produz conídios com 25 – 50 µm de comprimento por 10 – 15 µm de largura (COOKE & GOODFREY, 1964; VAN OORSHOT, 1985). Seus esporos podem ser de dois tipos: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos em número limitado, ou esporos com paredes grossas mais resistentes – clamidósporos, intercalados com hifas maduras (GRØNVOLD et al., 1996), em condições de crescimento desfavoráveis (SCHOLLER & RUBNER, 1994). Faedo et al. (2000) mencionam que *D. flagrans* afeta predominantemente helmintos cujos ovos possuem estágio de desenvolvimento curto, mas podem sobreviver ocasionalmente por longos períodos afetando também nematóides cujos ovos eclodem após 12 – 16 semanas, pois enquanto as larvas residem no ovo, esse fungo é incapaz de capturá-las.

De acordo com Sanyal et al. (2004) e Terril et al. (2004), *D. flagrans* é utilizado com sucesso no controle biológico de helmintoses gastrintestinais de animais domésticos devido a grande produção de clamidósporos que são altamente resistentes a condições adversas, o que o torna um potencial controlador biológico. Segundo Faedo et al. (2002b), os clamidósporos formados resistem à passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos (LARSEN et al., 1994; LARSEN et al., 1998) e bovinos (LARSEN et al., 1992; WOLSTRUP et al., 1994) e são capazes de germinar, colonizar o bolo fecal e proporcionar a destruição das L3 infectantes que estão emergindo, determinando com isso uma interrupção no ciclo de vida do parasito (FERNANDEZ et al., 1997; FAEDO et al., 1998). Administrado como clamidósporo a ruminantes, *D. flagrans* demonstra habilidade de reduzir eficientemente (acima de 90%) o desenvolvimento larval de um grande número de helmintos nas fezes (KAHN et al., 2007).

A partir dos trabalhos de Larsen et al. (1991 e 1992), que observaram a capacidade de *D. flagrans* de aparecer intacto nas fezes, começou o desenvolvimento de estudos a campo. Vários trabalhos têm demonstrado que *D. flagrans* é altamente eficaz para reduzir o número de larvas na matéria fecal e, como consequência, na pastagem. Estes trabalhos se baseiam na

deposição sobre a pastagem de matéria fecal que contém um número conhecido tanto de ovos de nematódeos como de clamidósporos.

Mediante amostragens periódicas do pasto ao redor das deposições fecais é possível estimar a redução de larvas devido à ação fúngica, ao comparar-se com fezes controles que não contenham fungos. Assim, sob diferentes condições de estudo, a eficácia de *D. flagrans* contra parasitos de bovinos tem sido de 74-85% (GRØNVOLD et al., 1993), 83% (BIRD & HERD, 1995), 55-64% e 78-94% (FERNÁNDEZ et al., 1999a), 85%, 30-40% e 73-84% (FERNÁNDEZ et al., 1999b; JOBIM et al., 2008).

Tem-se realizado estudos com animais em pastoreio, aos quais foram administradas diferentes doses fúngicas. Larsen et al. (1995), Nansen et al. (1995) e Wolstrup et al. (1994) demonstraram que o uso de *D. flagrans* resultou em redução da infectividade das pastagens e, em consequência, uma diminuição da carga parasitária adquirida pelos animais em pastoreio. Outros estudos compararam o efeito de diferentes doses fúngicas e demonstraram que para aplicar corretamente o controle biológico não somente deve-se ter em conta a dose fúngica a usar, mas também outros fatores, tais como nível inicial de larvas nas pastagens e carga parasitária animal (FERNÁNDEZ et al., 1999c).

Em experimento para se determinar os efeitos do fornecimento de *D. flagrans* crescidos em grãos de cevada a ovinos, observou-se redução significativa na contagem do número de ovos por grama de fezes (KNOX & FAEDO, 2001).

Um aspecto muito importante no uso de fungos nematófagos é o impacto ambiental que a presença massiva destes nas fezes animais poderia ocasionar. Yeates et al. (1997) realizaram um estudo para determinar um possível efeito de *D. flagrans*, usado para o controle de nematódeos de ovinos, sobre nemátodos do solo. Os resultados mostraram que não houve mudança na fauna nematódea do solo, e os autores concluíram que o uso do fungo não tem efeitos ambientais adversos. Fernández et al. (1999a, b) estudaram se a presença massiva de *D. flagrans* afetava a degradação normal das fezes bovinas. Ambos estudos indicaram uma carência de efeitos prejudiciais na degradação fecal quando o fungo foi usado para combater estágios de vida livre de *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora* e *Dictyocaulus viviparus*.

A ação de *D. flagrans* foi avaliada em um experimento onde fezes de cavalos contendo ovos de nematódeos strongilídeos foram tratadas com fungos e incubadas em diferentes temperaturas constantes (10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C). Os resultados indicaram

que a temperatura ótima de desenvolvimento do ovo até o estágio larval infectante (L3) foi de 25°C. A 10°C o número de L3 recuperado foi praticamente zero. Entretanto, quando estes cultivos foram incubados por um período adicional de 14 dias a 27°C permitiram o desenvolvimento até L3. A 25°C e 30°C os fungos ocasionaram reduções acima de 90% no número de L3 (SANTOS et al., 2001).

Grønvold et al. (1999), realizando trabalhos *in vitro* com fezes de bovinos, estudaram alguns fatores bióticos e abióticos que influenciam o crescimento de *D. flagrans* e perceberam que a produção de hifas é estimulada pela presença de larvas, porém ele não as produz em condições anaeróbias. Ainda, perceberam que a sobrevivência das hifas é mais prolongada na temperatura de 10°C quando comparada com a sobrevivência na temperatura de 20°C e 30°C.

A ação da temperatura sobre a evolução de larvas a partir de ovos de *Haemonchus contortus* foi avaliada por Coyne & Smith (1992). Nesse experimento os autores observaram que a recuperação de larvas L3 é maior quando a temperatura varia entre 20 e 30°C com umidade relativa de 100%. Já Faedo et al. (2002a) concluíram que, quando o fungo é misturado com fezes de bovinos, a alta umidade (mais de 95%) inibe significativamente sua atividade e com umidade mais baixa (68%) a atividade do fungo é maior.

Recentemente, Jobim et al. (2008) utilizaram quantidades padronizadas de *D. flagrans* em bovinos a campo para avaliar sua eficácia no controle biológico de helmintos no município de Julio de Castilhos (RS). Os trabalhos demonstram uma redução de 57% na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e a quantidade de larvas reduziu 77% na pastagem quando comparado a um grupo controle. Entretanto, foi observado que com excesso de umidade (período chuvoso) a ação do fungo diminui, o que sugere uma dependência de sua ação com fatores climáticos.

D. flagrans também é eficiente na predação e controle de L3 dos nematóides parasitas *Heligmosomoides polygyrus* (MORGAN-JONES et al., 1997), *Dictyocaulus viviparus* (HENRIKSEN et al., 1997), *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* (LARSEN et al., 1996), *Oesophagostomum dentatum*, *Hyostrongylus rubidius* (NANSEN et al., 1996), *Teladorsagia circumcincta* (PELOILLE, 1991), ciatostomídeos de equinos (SANTOS et al., 1995; FERNANDEZ et al., 1997). *Haemonchus contortus* (JUAREZ & MENDOZA-DE-GIVES, 1998; MENDOZA-DE-GIVES et al., 1998; PEÑA et al., 2002; CHANDRAWATHANI et al., 2003; JOBIM et al., 2008), *Trichostrongylus* sp., *Nematodirus* sp. (LARSEN et al., 1995; GITHIGIA et al., 1997); *Ostertagia circumcincta* e *Ostertagia ostertagi* (GRØNVOLD et al., 1993).

No solo, *D. flagrans* pode ser encontrado até 30 cm da superfície. Sua localização está diretamente ligada com a infiltração de seus clamidósporos na terra pela água da chuva, e via ação de outros animais como minhocas e artrópodes (KNOX et al., 2002). Nas fezes do hospedeiro e na pastagem, *D. flagrans* demonstrou ser promissor na captura e formação de armadilhas para nematóides (PEÑA et al., 2002; FONTENOT et al., 2003; PARAUD et al., 2007). Dias et al., (2007), trabalhando com formulação peletizada desse fungo em bovinos, observaram níveis de redução do OPG ($p < 0,05$) em comparação ao grupo-controle demonstrando sua viabilidade para controle de helmintos parasitos gastrintestinais.

3. MANUSCRITO

Influence of temperature on biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep

Rodrigo Buske^a, Jânio Morais Santurio^b, Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a, Liziane Aita Bianchini^a, Mário Luiz de la Rue^{a*}

^a *Human Parasitology Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Federal University of Santa Maria, Brazil*

^b *Mycology Research Laboratory (LAPEMI), Microbiology and Parasitology Department, Federal University of Santa Maria, Brazil*

* Corresponding Author:

Fax: +55 55 3220 8242;

Phone: +55 55 3220 8437;

Postal address: Microbiology and Parasitology Department, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: mldelarue@hotmail.com

ABSTRACT

In recent years the search for alternative methods to combat gastrointestinal parasites has increased, standing out the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans*. In this study, we analyze the possible influence of temperature on the nematophagous activity of *D. flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. We used four sheep, two parasitized with *H. contortus* and two dewormed. One dewormed sheep received for three consecutive days before the collection of feces 1×10^6 chlamydospores of *D. flagrans* lyophilized in gelatin capsules. After the feces were collected with the aid of collectors bags, they were mixed and resulted in samples with (fungus) and without fungus (control). Each sample was incubated at seven different temperatures (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C) for 21 days. After the incubation period, larvae recovery and counting was performed. The best temperature for fungus action was 30 °C, while no larvae were recovered at 5 °C. At 10 °C, the fungus action was detected but without significant difference in the percentage of larval reduction between temperatures, demonstrating that the presence of larvae seems to be the main factor affecting its nematophagous action. It can be concluded that temperature does not seem to be a limiting factor in the biological control activity of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*. Even at lower temperatures, the lyophilized *D. flagrans* reduced the number of *H. contortus* larvae, showing once more their biological control potential, even in non-ideal conditions for fungus and larvae development, can even be used in colder climates.

Keywords: *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, temperature, biological control, sheep

1. Introduction

Among the factors that affect the full development of the livestock industry, gastrointestinal parasitism occupies a prominent place (Macrae, 1993). Several control programs have been developed to minimize the adverse effects of gastrointestinal parasitism, some focused on the reduction of infective larvae on pasture using antihelminthics compounds, reducing the population of parasites in adult animals. However, despite antihelminthics compounds being the main tool, it has some limitations such as drugs residues in animal products (Padilha, 1996), toxic effects on non-target environmental organisms (Strong et al., 1996), and the antihelminthics resistance (Fao, 2003; Kaplan, 2004).

To develop other methods to minimize the use of antihelminthics to control the ruminant's nematodes, especially in continuous grazing systems, biological control seems to be an option to effectively and safely reduce the population of infective larvae of gastrointestinal nematodes in pastures (Larsen, 1999; Mota et al., 2003).

Several species of fungi have been studied as potential biological control agents, but the *Duddingtonia flagrans* species stood out, especially in Europe. Besides its high predation efficiency thanks to the development of three-dimensional nets, it produces large quantities of resistant spores (chlamydospores) that help the passage through the animal's gastrointestinal tract (Larsen et al., 1991 and Larsen et al., 1992). According to Faedo et al. (2002), the chlamydospores increased the resistance on the passage through the gastrointestinal tract of sheep (Larsen et al., 1994) and cattle (Larsen et al. 1992; Wolstrup et al., 1994), and are also capable to germinate, colonize the feces, and destroy newer infectious L3, interrupting the parasite life cycle (Fernandez et al. 1997; Faedo et al., 1998). When administered as chlamydospores to ruminants, *D. flagrans* reduces by over 90% the larval development of helminths in the stool (Kahn et al., 2007). The effectiveness of *D. flagrans* for biological control has been proved against several species of nematode parasites as follows:

Heligmosomoides polygyrus (Morgan-Jones et al., 1997), *Dictyocaulus viviparus* (Henriksen et al., 1997), *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* (Larsen et al., 1996), *Oesophagostomum dentatum*, *Hyostrogylus rubidus* (Nansen et al., 1996), *Teladorsagia circumcincta* (Peloille, 1991), equine cyathostomes (Santos et al. 1995; Fernandez et al., 1997), *Haemonchus contortus* (Juarez & Mendoza-De-Gives, 1998; Mendoza-De-Gives et al. 1998; Peña et al., 2002; Chandrawathani et al., 2003; Jobim et al., 2008), *Trichostrongylus* sp., *Nematodirus* spp (Larsen et al. 1995; Githigia et al., 1997), *Ostertagia circumcincta*, and *Ostertagia ostertagi* (Grønvold et al., 1993).

Grønvold et al. (1996) in vitro experiments described that *D. flagrans* grow best between 20-30 °C and rainfall amounts between 15-60 mm per week. In another in vitro study conducted with bovine feces, Grønvold et al. (1999) studied some biotic and abiotic factors that influence the growth of *D. flagrans*, realizing that the production of hyphae is enhanced by the presence of larvae, whereas the production does not happen under anaerobic conditions. Moreover, they realized that hyphae live longer at 10 °C compared to 20 °C and 30 °C conditions. However, in the warmer temperatures hyphae are produced faster than at 10 °C.

Since the sheep industry in Southern Brazil presents high economic importance and the region has annual mean temperature below 20° C, this study aims to evaluate the influence of temperature on the biological control activity of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*, lyophilized and administered in gelatin capsules, against L3 larvae of *Haemonchus contortus* in sheep.

2. Materials and methods

2.1. Samples preparation and lyophilized *D. flagrans* production

The *D. flagrans* samples, strain ARSEF 5701 (Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures) were obtained from the *Mycology Research Laboratory (LAPEMI)* of the *Federal University of Santa Maria (UFSM)*.

The samples were maintained in Petri dishes with 9 cm diameter containing 20 ml of potato dextrose agar 2% (PDA 2%) at 25 °C.

The production of lyophilized chlamydospores used the technique described by Santurio et al. (2009).

2.2. *Characterization of animals*

Four female adult sheep between 2 and 3 years old and weighing between 40 and 50 kg were used. The animals were kept on pasture and water *ad libitum* and supplemented with 500 grams of sheep food per day.

The use of animals in the research was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the UFSM under number 23081.013230/2008-47.

The four animals were naturally infected with the nematode *Haemonchus contortus* and other strongyles, which were eliminated with Ivermectin 1% (Jofadel: Varginha /MG). The subsequent reinfection by *H. contortus* was unnecessary since they were resistant to the previous treatment. Two of the four sheep continued infected with *H. contortus* to donate eggs and two were completely dewormed using Moxidectin 1% (Cydectin Injectable - Fort Dodge Animal Health Ltd: Campinas/SP).

2.3. *Experimental Design*

2.3.1. Fungi Administration: One dewormed sheep received on a daily basis by three consecutive days before the collection of feces the maintenance ration together with five

gelatin capsules containing 2×10^5 lyophilized chlamyospores of *D. flagrans*, totalizing 1×10^6 , while the others received the maintenance ration only.

2.3.2. Fecal Samples: After the fungus was administered, the feces of the four animals were collected with a collecting bag of cotton. The feces of the two sheep infected with *H. contortus* were mixed homogeneously and then half of it was mixed with the ones of the dewormed animal that had not receive chlamyospores and the other half with the faeces of the dewormed sheep that had received chlamyospores, at equal proportions, resulting in two fecal samples groups:

- Control, with *H. contortus* eggs and no chlamyospores;
- *D. flagrans*, with *H. contortus* eggs and chlamyospores.

The feces with and without chlamyospores were mixed (1:1), and the resulting sample containing about 5×10^5 chlamyospores was analyzed and incubated in the laboratory.

The confirmation of the infection by *H. contortus* was performed with the Gordon & Whitlock (1939) technique modified by Lima (1989) to determine the eggs per gram of feces (EPG), and by fecal culture, where feces were mixed into sawdust, humidified and incubated for 14 days to grow at a constant temperature of 27 °C. After the incubation, the infective larvae (L3) recovery was performed according to the Roberts & O'Sullivan (1950) technique to identify larvae.

In order to confirm the presence of chlamyospores in the feces the Ojeda-Roberts et al. (2007) technique was used to count the chlamyospores per gram of feces (CPG).

2.3.3. Analysis of the influence of temperature on fungus activity: The two feces groups (control and *D. flagrans*) were incubated at seven different temperatures - 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35 ° C - during 21 days in plastic collectors of 100 ml containing approximately 10 g

of each sample and 5 g of sawdust to simulate the soil conditions, and been moistened when necessary. Five replicates were performed for each temperature and sample.

2.3.4. Larvae recovery and counting: After 21 days of incubation, the larval recovery of each sample was conducted according to Roberts & O'Sullivan (1950) technique. The liquid obtained from larval recovery was stored in 50 ml Falcon tubes. The tubes were centrifuged and the supernatant removed leaving approximately 2 ml on each. Then, 1 ml of Lugol was added to each tube to kill and color the larvae. To estimate the number of larvae, five aliquots of 50 ml from each tube were counted and the number adjusted to a 3ml volume.

2.4. Statistical Analysis

The Kruskal-Wallis test was used to analyze the influence of temperature on the number of larvae recovered from fungus and control samples, and on the percent reduction of larvae (fungus activity). The Mann-Whitney test was used to compare the number of larvae on fungus and control samples at each temperature. All tests were conducted at a significance level of 5% ($p < 0.05$).

The *D. flagrans* effectiveness was determined by the percent reduction of larvae from the group with fungus over the control using the equation:

% Reduction = $(X_c - X_f)/X_c \times 100$, where X_c is control group data and X_f is fungus group data, and X_c must be greater ($>$) than X_f and different from zero (0), according to the formula used by Terrill et al. (2004).

3. Results

3.1. EPG and CPG of the D. flagrans and control samples

The sample with the fungus had 800 eggs per gram of feces (EPG) and 400 chlamydospores per gram of feces (CPG). The control sample showed 900 EPG and a negative CPG, further confirmed by fecal culture.

3.2. Influence of temperature on *D. flagrans* nematophagous activity

As shown in Table 1, increasing temperature increased the percent reduction of larvae, except at 20° C. However, there was no statistically significant difference in percent reduction of larvae between different temperatures. The maximum reduction was at 30 ° C.

3.3. Influence of temperature in larvae recovery

No larva has been recovered at 5°C. The number of recovered larvae increased as the temperature increased, but statistically significant difference for larvae recovered from fungus samples was found only between 5°C and 25°C, 5°C and 30°C, 10°C and 25°C, and 10°C and 30 °C temperatures. In the control samples, it has been found statistically significant difference only between 5°C and 25°C, 5°C and 30°C, and 10°C and 30°C temperatures. Figure 1 shows that in the sample with *Duddingtonia flagrans* the larvae number starts to decrease at 25°C while in the control sample the larvae number decreases at 30°C. The average number of recovered larvae was higher in the control group than in the fungus one, but there was statistically significant difference only between 30°C and 35°C temperatures.

4. Discussion

Our results showed that lyophilized *D. flagrans* was effective to reduce the number of *H. contortus* larvae even at lower temperatures and, as temperature increases, the rate of predation tends to increase, although no statistically significant difference between the temperatures has been found, unlike the data from Paraud et al. (2006). Grønvold et al. (1999) demonstrated that the production of hyphae was enhanced by the presence of larvae and that it lives longer at 10°C than at 20°C and 30°C, but it was produced more rapidly at higher temperatures.

According to Onyah & Arslan (2005), the optimum temperature for the *H. contortus* larvae survival is between 18 and 26°C. Based on this information, we can infer that in our data the temperature had a direct influence on the fungus activity and/or the temperature increase raised the larval motility which, in turn, stimulated the hyphal growth of the fungus and, consequently, its nematophagous activity. The latter reason seems to be the main factor affecting the fungus activity, since there was no statistically significant difference in the percent reduction between temperatures. It can be inferred that the fungus acts the same way at different temperatures and that temperature does not seem to limit the activity of *D. flagrans*, but the presence/absence of larvae.

Grønvold et al. (1996) found that the maximum production of traps occurs at 30°C, declining at higher temperatures (35 ° C and 40 ° C). Differently, Paraud et al. (2006) found a 100% predation rate of *D. flagrans* against *H. contortus* at 21°C and 89% at 28°C. The difference between the studies may be explained by the experiments conditions and their different larvae quantities, reinforcing our hypothesis that temperature is not a determining factor for the *D. flagrans* activity against *H. contortus*, but the larvae amount and thus the stimulus.

The fact that the fungus reduced the larvae amount even at lower temperatures indicates that such biological control could also be used in colder regions. At lower temperatures the development of *H. contortus* is slower, but according to Grønvold (1999) the *D. flagrans* also lives longer. So when the temperature increased, the larvae development was accompanied by the fungus development, which could be useful to control large amounts of larvae that hatch in the spring after the winter hypobiosis. In other words, the use of *D. flagrans* for biological control of *H. contortus* in sheep has a great potential, even in non-ideal conditions for their development.

Despite the absence of statistically significant difference in percent reduction of larvae in different temperatures, comparing the larvae amount recovered from the *D. flagrans* and control samples, there was statistically significant difference in 30°C and 35°C temperatures, which could be attributed to the fungus activity. The lower fungus efficiency at 20°C - 14.4% (see Table 1) - can be explained by the random larval hatching, as described by Onyah & Arslan (2005), which may have led to lower larval hatching and consequently lower stimulus to the fungus, reducing its effectiveness. Moreover, according to Schillhorn (1986), the helminth eggs are not equally distributed in feces, and using the McMaster technique in replicates generates an average EPG variation from 22 to 270% (Mes, 2003).

At the optimum temperature for fungal activity (30 °C) according to Grønvold et al. (1996), *D. flagrans* reduced the larvae by 74.5% with an administration of 1×10^6 lyophilized chlamyospores for three consecutive days (around 5×10^5 in the coproculture, as the feces were mixed). The slight reduction found in our study compared to Paraud et al. (2007) and Peña et al. (2002) results can be explained by a smaller quantity of eggs in feces (900 EPG) or by the fact that in our experiment the chlamyospores passed through the gastrointestinal tract of sheep and, therefore, some chlamyospores were destructed during the process. The previously mentioned experiments had only manual deposition of chlamyospores on stool. Ojeda-Roberts et al. (2008) obtained a chlamyospores recovery rate between 6.2% and 12.3% when doses between 19.5 and 177.5×10^6 chlamyospores/kg/body weight were administered. Silva et al. (2009) administering 4.5×10^6 chlamyospores per animal in gelatin capsules obtained 30.13% chlamyospores in the feces. These results are promising considering that only 1×10^6 chlamyospores were administered in gelatin capsules for three consecutive days before the fecal samples were collected. It generates a positive evaluation of this new kind of *D. flagrans* formulation, not only because it does not interfere with their effectiveness, but also because it is easier the transport and administrate to animals.

Although the doses differed in biological control for different species, it is necessary to take into account the initial amount of larvae on pasture and in animals (Fernandez et al., 1999) as well as climatic conditions (Eysker et al., 2005). More studies are needed to standardize the dosage of chlamydospores in accordance with the infection level of the herd, since the larvae amount seems to be the main factor affecting nematophagous activity of *D. flagrans*.

In this study we could concluded that temperature does not seem to be a limiting factor in the biological control of *Haemonchus contortus* in sheep using the *Duddingtonia flagrans* fungus. Even at lower temperatures, lyophilized *D. flagrans* reduced the number of *H. contortus* larvae in sheep, demonstrating once more its potential for biological control, even in non-ideal development conditions.

5. References

- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Waller, P.J., Larsen, M., Gillespie, A.T., Zahari, W.M., 2003. Biological control of nematodes parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 117, 173-183.
- Eysker, M., Bakker, N., Kooyman, F.N.J., van der Linden, D., C. Schrama, C., H.W. Ploeger, H.W., 2005. 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* 133, 313-321.
- Faedo, M., Barnes, E.H., Dobson, R.J., Waller, P.J., 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 76, 129 -135.

- Faedo, M., Larsen, M., Dimander, S.O., Yeates, G.W., Höglund, J., Waller, P.J., 2002. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological Control* 23, 64-70.
- Fao., 2003. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina, Salud Animal. Roma, FAO.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Henriksen, S.A., Bjørn, H., Wolstrup, J., 1999. The efficacy of two isolates of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. *Veterinary Parasitology* 85, 289-304.
- Fernandez, A.S., Larsen, M., Waller, P.J., 1997. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 72, 149 – 155.
- Githigia, S.M., Thamsborg, S.M., Larsen, M., 1997. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. *International Journal for Parasitology* 27, 931-939.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* 12, 50-52.
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Larsen, M., Henriksen, S.A., Bjørn, H., Kirchheiner, K., Lassen, K., Rawat, H., Kristiansen, H.L., 1999. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. *Journal of Helminthology* 73, 129-136.
- Grønvold, J., Nansen, P., Henriksen, S.A., Larsen, M., Wolstrup, J., Bresciani, J., Rawat, H., Fribert, L., 1996. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Helminthology* 70, 291-297.

- Grønvold, J., Wolstrup, J., Larsen, M., Henriksen, S.A., Nansen, P., 1993. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. *Helminthology* 67, 31-36.
- Henriksen, S.A., Larsen, M., Grønvold, J., Nansen, P., Wolstrup, J., 1997. Nematode-trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 38, 175-179.
- Jobim, M.B., Santurio, J.M., de la Rue, M.L., 2008. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. *Ciência Rural* 38, 2256 – 2263.
- Juarez, R.D.L., Mendoza-de-Gives, P., 1998. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. *Journal of Helminthology* 72, 155-158.
- Kahn, L.P., Norman, T.M., Walkden-Brown, S.W., Crampton, A., O'Connor, L.J., 2007. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. *Veterinary Parasitology* 146 (1-2), 83-89.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20, 477-481.
- Larsen, M., 1999: Biological control of helminths. *International Journal of Parasitology* 29, 139-146.
- Larsen, M., Faedo, M., Waller, P.J., 1994. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. *Veterinary Parasitology* 53, 275-281.
- Larsen, M., Nansen, P., Grøndahl, C., Thamsborg, S.M., Grønvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., Monrad, J., 1996. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture fed to animals under natural grazing conditions. *Parasitology* 113, 1-6.

- Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., Gronvold, J., Henriksen, S.A., Zorn, A., 1995. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. *Veterinary Parasitology* 60, 321-330.
- Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., Gronvold, J., Nansen, P., 1992. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of Helminthology* 66, 137 – 141.
- Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., Dackman, C., Grønvold, J., Nansen, P., 1991. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *Journal of Helminthology* 65, 193-200.
- Lima, W.S., 1989. Dinâmica das populações de nematódeos parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG, Brasil. PhD Thesis. Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte. 178p.
- Macrae, J.C., 1993. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proceedings of the Nutrition Society* 52, 121-130.
- Mendoza-de-Gives, P., Crespo, J.F., Rodriguez, D.H., Prats, V.V., Hernandez, E.L., Fernandez, G.E., 1998. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores to sheep. *Journal of Helminthology* 72, 343-347.
- Mes, T.H.M., 2003. Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures. *Veterinary Parasitology* 115, 311–320.
- Morgan-Jones, G., Behnke, J.M., Lucas, J.A., Peberdy, J.F., 1997. *In vitro* assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. *Parasitology* 115, 303- 310.

- Mota, M.A., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23, 93-100.
- Nansen, P., Larsen, M., Roepstorff, A., Grønvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., 1996. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrogylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitology Research* 82, 580-584.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A., Aguilar-Caballero, A.J., Cob-Galera, L.A., Mendoza-de-Gives, P., 2008. A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. *Veterinary Parasitology* 152, 339-343.
- Onyiah, L.C., Arslan, O., 2005. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *Journal of Thermal Biology* 30, 203–211.
- Padilha, T., 1996. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: Padilha, T. (Ed.). Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Embrapa, CNPGL, Coronel Pacheco, Brazil, pp.77-93.
- Paraud, C., Pors, I., Chartier, C., 2007. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. *Veterinary Research Communications* 31, 305-315.
- Paraud, C., Pors, I., Chicard, C., Chartier, C., 2006. Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture. *Parasitology Research* 98, 207–213.
- Peloille, M., 1991. Selection of nematode-trapping fungus for use in biological control. In: Kerry, B. R.; Crump, D. H. (Eds.). Methods for studying nematophagous fungi. *Bulletin of*

the Organisation Internationale de Lute Biologique et Integree Contre Les Animaux et les Plantes Nuisibles. London: IOBC/WPRS, pp.13-17.

Peña, M.T., Miller, J.E., Fontenot, M.E., Gillespie, A., Larsen, M., 2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of sheep. *Veterinary Parasitology* 103, 259-265.

Roberts, F.H.S., O'Sullivan, J.P., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research* 1, 99.

Santos, C.P., Charles, T.P., Rodrigues, M.L.A., 1995. Atividade predatória de *Arthrotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* em estádios pré-parasitários de ciatostomídeos em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 4, 113.

Santurio, J.M., Zanette, R.A., Da Silva, A.S., de la Rue, M.L., Monteiro, S.G., Alves, S.H., 2009. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydozoospores production for livestock use. *Veterinary Parasitology* 164, 344- 346.

Schillhorn, T.W.V.V., 1986. Methods for diagnosis of parasitism in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2, 335–344.

Silva, A.S., Zanette, R., Gressler, L.T., Dalla Rosa, L., Santurio, J.M., Monteiro, S.G., 2009. Técnicas parasitológicas adaptadas para quantificação de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* em fezes ovinas e na pastagem. *Veterinária e Zootecnia* 16, 373 – 378.

Strong, L., Wall, R., Woolford, A., Djeddour, D., 1996. 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* 62, 253-266.

Terril, T. H., Larsen, M., Samples, O., Husted, S., Miller, J.E., Kaplan, R.M., Gelaye, S., 2004. 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*, 120: 285-296.

Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S.A., Nansen, P., Larsen, M., Bøgh, H.O., Ilsøe, B., 1994. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. *Journal of Helminthology* 68, 175-180.

Table 1. Mean Number of Larvae Recovered (MNLr) at each temperature and the corresponding percentage reduction (action of the fungus).

Temperature (°C)	<i>D. flagrans</i>		Control		Percentage Reduction (Action of the fungus)
	MNLr	Standard Deviation	MNLr	Standard Deviation	
5	0	0	0	0	0
10	16.8	24.8	28.8	17.8	41.7
15	134.4	55.4	278.4	175.0	51.7
20	242.4	84.6	283.2	159.1	14.4
25	811.2	567.2	2095.2	2425.6	61.3
30	626.4	156.3	2455.2	1139.7	74.5
35	180	104.9	369.6	40.1	51.3

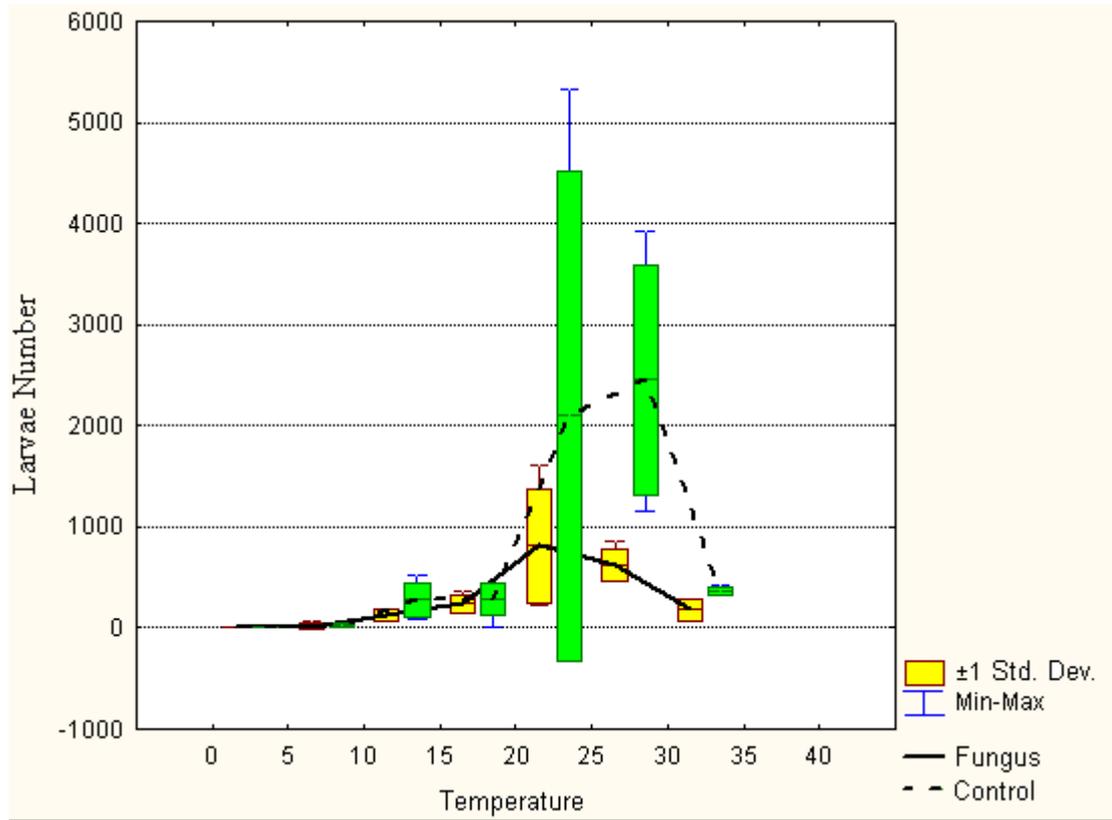


Figure 1. Amount of larvae recovered at each temperature (°C) in the *D. flagrans* and control samples.

4. BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 275-289. 1986.

ACHI, Y. L.; ZINSSTAG, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 151–158, 2003.

ALCÂNTARA, V. S. B.; AZEVEDO, J. L. Isolamento e seleção de fungos predadores de nematóides. **Revista Agrícola**, v.56, n.1, p. 135–146, 1891.

ALLONBY, E. W.; URQUHART, G. M. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a merino flock in east Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 1, p. 129-143, 1975.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 91–106, 2004.

ARAÚJO, J. V. **Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do gênero *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos.** 1996. 110p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddigtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, n.2, p. 65-71, 2004b.

ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; GUIMARÃES, M. P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the netadode-trapping fungus

Arthrobotrys robusta. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle de Helminthos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, p. 165-169, 2004a.

ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MAGALHÃES, A. C. M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.44, n.6, p. 521-526, 1992.

ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MAIA, A. S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys fungi* on infective *Haemonchus placei* larvae. **The Journal of the Helminthology**, v.67, n.2, p. 136-138, 1993.

AROSEMENA, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid areas in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 150, p. 873-876. 1999.

ATLAS Socioeconômico Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/ATLAS/atlas.asp?menu=340>>. Acesso em: junho de 2008.

BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal for Parasitology**, v.29, p. 41-47, 1999.

BARRON, G. L. **The Nematode-destroying Fungi**. Golph: Canadian Biological Publications, 1977, 140 p.

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. **Anais...**, Yokohama, 1995, p.151.

BOWMAN, D. D. et al. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed., Barueri: Manole, 2006, 422p.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O.; MACIEL, A. S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n. 3, p. 356 -358, 2007.

BRAGA, R. M.; GIRARDI, J. L. População de larvas de helmintos infestantes de ovinos em pastagem nativa de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 569-574. 1991.

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A.; ARAÚJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação dos fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp., submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p. 465-469, 2004.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P. J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. T.; ZAHARI, W. M. Biological control of nematodes parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 173-183, 2003.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasites de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 437-442. 1995.

CHARLES, T. P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 335-343. 1989.

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.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p.71-75, 1989.

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

COOP, R. L. AND KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of parasitism in livestock. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 325–330, 2001.

COOP, R. L., SYKES, A. R.; ANGUS, K.W. The effect of a daily intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on body weight, food intake and concentration of serum constituents in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 23, p. 76–83, 1977.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. S. **Controle de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará**. EMBRAPA-CNPC, Sobral, Comunicado Técnico, n. 13, 1984, 6p.

COYNE, M.J.; SMITH, G. The development and mortality of the free-living stages of *Haemonchus contortus* in laboratory culture. **International Journal of Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 641-650, 1992.

DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V; CAMPOS, A. K.; BRAGA, F. R.; FONSECA, T. A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.38, p. 1245-1252, 2007.

DIMANDER, S. O. J.; HÖGLUND, A.; UGGLA, E.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P. J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p.193–209, 2003.

DRESCHLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. **Mycologia**, v.29, p. 447-552, 1937.

DUDDINGTON, C. L. **The friendly fungi – a new approach to the eelworm problem**. London: Faber and Faber, 1957, 188 p.

EVANS, K.; TRUDGILL, D. L.; WEBSTER, J. M. **Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture**. Wallingford: CAB International, 1993, 648 p.

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.; BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, p. 129 -135, 1998.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J. Predacious activity of *Duddingtonia flagrans* within the cattle faecal path. **Journal of Helminthology**, v.76, p. 295-302, 2002a.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; THAMSBORG, S. Effect of different times of administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture – a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.94, p. 55-65, 2000.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S. O.; YEATES, G. W.; HÖGLUND, J.; WALLER, P. J. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, v.23, n.1, p. 64-70, 2002b.

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

FARIAS, M. T.; BORDIN, E. L.; FORBES, A. B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 209-214. 1997.

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.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; BJØRN, H.; WOLSTRUP, J. 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, 1999a.

FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENNINGSEN, E.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; BJØRN, H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of infective *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. **Journal of Helminthology**, v. 73, p.115-122, 1999b.

FERNANDEZ, A. S.; LARSEN, M.; WALLER, P. J. The potencial of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 149 – 155, 1997.

FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; HENNINGSEN, E.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; BJØRN, H.; WOLSTRUP, J. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. **Parasitology**, v. 119, p.105-111, 1999c.

FERRAZ, S.; MAIA, A. S.; MUCHOVEJ, J. J. Detecção, isolamento, identificação e avaliação *in vitro* da capacidade predatória dos fungos nematófagos em solos brasileiros. **Nematologia Brasileira**, v. 16, n.1-2, p.85, 1992.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. A hemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 37-45 .1998.

FONTENOT, M. E.; MILLER, J. E.; PEÑA, M. T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematodes larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.3-4, p.203 – 213, 2003.

FOREYT, W. J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. 5ª Ed., São Paulo: Roca, 2005, 240p.

FREIRE, F. C. O; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juvenis of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.3, p. 557-596, 1985.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. de L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**: ciências agrárias. Viçosa: UFV, 2006. 84p. (Caderno Didático, 58)

GAMARRO, F.; CASTANY, S. Mecanismos de resistência a fármacos em parasitos. In: López, L.R.; López, M.C. **Parasitologia Molecular**. Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid; p. 135-145. 1993.

GÁRATE, T.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E. Antigenos de helmintos parasitos em proteccion y patologia. In: López, L.R.; López, M.C. **Parasitologia Molecular**. Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid; p. 287-303. 1993.

GILL, H. S.; LE JAMBRE, L. F. Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. **International Journal of Parasitology**, v.26, p. 797-1007, 1996.

GITHIGIA, S. M.; THAMSBORG, S. M.; LARSEN, M. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal of Parasitology**, v. 27, n.8, p. 931-939, 1997.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**. v.12, p.50-52, 1939.

GRAMINHA, E. B. N. **Isolamento e atividade predatória de fungos nematófagos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP**. 2004. 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, v. 62, p. 245-304, 1987.

GRAY, N. F. Fungi Attacking vermiform nematodes. In: Poinar, O.G.; Borne, J.H. (Eds.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p.3-38, 1988.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994, 458 p.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S. A.; BJØRN, H.; KIRCHHEINER, K.; LASSEN, K.; RAWAT, H.; KRISTIANSSEN, H. L. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. **Journal of Helminthology**, v. 73, p. 129-136, 1999.

GRØNVOLD J; HENRIKSEN S A; LARSEN M; NANSEN P; WOLSTRUP J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v. 64, n. 1-2, p.47-64. 1996a.

GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. 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.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. **Helminthology**, v. 67, p.31-36, 1993.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 311-325, 1993.

HAY, F. S.; NIEZEN, J. H.; MILLER, C.; BATESON, L.; ROBERTSON, H. Infestation of sheep dung by nematophagous fungi and implications for the control of free-living stages of gastro-intestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.70, p. 247-254, 1997.

HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Nematode-trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, p. 175-179, 1997.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS – IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=2&i=P>>. Acesso em: junho 2008.

JACQUIET, P.; CABARET, J.; THIAM, E.; CHEIKH, D. Host range and the maintenance of *Haemonchus* spp. in an adverse arid climate. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 253-261, 1998.

JAFEEE, B. A.; STORNG, D. R.; MULDOON, A. E. Nematode-trapping fungi of the natural scrubland: tests for food chain involvement. **Mycologia**, v.88, n.4, p. 444-564, 1996.

JOBIM, M. B.; SANTÚRIO, J. M.; DE LA RUE, M. L.. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. **Ciência Rural**, v.38, n. 8, p. 2256 – 2263, 2008.

JUAREZ, R. D. L.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Resistence of nematophagous fungi chlamydospores to the digestive processes of sheep in Mexico. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 155-158, 1998.

JUNIPER, A. J. Dung as a source of predacious fungi. **Transaction British Mycological Society**, v.40, n.2, p. 346-348, 1957.

KAHN, L. P.; NORMAN, T. M.; WALKDEN-BROWN, S. W.; CRAMPTON, A.; O'CONNOR, L. J. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperature existing at lambing in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n.1-2, p. 83-89, 2007.

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

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n.1, p. 323-441, 2000.

KERRY, B. R.; SIMON, A.; ROVIRA, A. D. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, v.105, p. 509-517, 1984.

KNOX, M. R.; FAEDO, M. Biological control on field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore intake on efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.2, p. 155-160, 2001.

KNOX, M. R.; JOSH, P. F.; ANDERSON, L. J. Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. **Biological Control**, v.24, n.1, p.176-182, 2002.

KRECEK, R. C.; GROENEVELD, H. T.; VAN WIK, J. A. Effects of time of day, season and stratum on *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* third-stage larvae on irrigated pasture. **Veterinary Parasitology**, v. 40, p. 87-98, 1991.

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

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.53, p. 275-281, 1994.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONDAHL, C.; THAMSBORG, S. M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; MONRAD, J. The capacity of fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture fed to animals under natural grazing conditions. **Parasitology**, v. 113, p. 1-6, 1996.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia*

flagrans fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. *In vivo* passage of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v.66, p. 137 – 141, 1992.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; DACKMAN, C.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v.65, p. 193-200, 1991.

LIMA, W. S. **Dinâmica das populações de nematódeos parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG, Brasil.** 1989. 178f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1989.

MACRAE, J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.52, p. 121-130, 1993.

MAIA, A. S.; FERRAZ, S. Detecção e isolamento de fungos nematófagos de solos brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, 1993, Jaboticabal, **Resumos...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1993. p. 68.

MENDOZA-DE-GIVES, P.; CRESPO, J. F.; RODRIGUEZ, D. H.; PRATS, V. V.; HERNANDEZ, E. L.; FERNANDEZ, G. E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, v.72, p. 343-347, 1998.

MENDOZA-DE-GIVES, P.; DAVIES, K. G. CLARK, S. J.; BEHNKE, J. M. Predatory behavior of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p. 95-104. 1999.

MES, T. H. M. Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures, **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 311–320, 2003.

MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Infections events in the fungus-nematode system, In: Poinar O.G. & Borne J.H. (ed.) **Diseases of Nematodes**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988, p. 59-62.

MORGAN-JONES, G.; BEHNKE, J. M.; LUCAS, J. A.; PEBERDY, J. F. *In vitro* assessment of influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. **Parasitology**, v. 115, n.3, p. 303-310, 1997.

MOTA, M. A. CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. 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.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; ZORN, A.; HENRIKSEN, S. A. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.81, p. 371-374, 1995.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.82, p. 580-584, 1996.

NARI, A.; SALLES, J.; GIL, A.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites in sheep in Southern Latin America: Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.62, p. 213-222, 1996.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no Semi-árido Paraibano, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 71-75. 2003.

OJEDA-ROBERTOS, N. F. *et al.* A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 339-343, 2008.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 203–211, 2005.

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.

PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.3, p.305-315, 2007.

PARAUD, C.; PORS, I.; CHICARD, C.; CHARTIER, C. Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture. **Parasitology Research**, v. 98, p. 207–213, 2006.

PEARSSON, Y.; ERLAND, S.; JANSSON, H. B. Identification of *Arthrobotrys* species using RFLP analysis of PCR amplified rDNA. **Nematologica**, v.41, p. 329-332, 1995.

PELOILLE, M. Selection of nematode-trapping fungus for use in biological control. In: Kerry, B. R.; Crump, D. H. (Eds.). **Methods for studying nematophagous fungi**. Bulletin of the Organisation Internationale de Lute Biologique et Integree Contre Les Animaux et les Plantes Nuisibles. London: IOBC/WPRS, p. 13-17, 1991.

PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.259-265, 2002.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p.145-168, 1999.

PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. **Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1998, 438 p.

PRIA, M. D. **Controle Biológico de *Meloidogyne incognita*, Raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados**. 1992. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

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.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1889-1895, 2004.

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

ROSSANIGO, C. E.; GRUNER, L. Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. **Jornal of Helminthology**, v. 69, p. 357-362. 1995.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 89-109. 2001.

SANGSTER, N. C., BANNAN, S. C., WEISS, A. S., NULF, S. C., KLEIN, R. D., GEARY, T. G. *Haemonchus contortus* sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from glycoproteins and an association with avermectin resistance. **Experimental Parasitology**, v. 91, p.250-257, 1999.

SANTOS, C.; PADILHA, T. R.; AZEVEDO, M. L. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pré-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 839-842, 2001.

SANTOS, C. P.; CHARLES, T. P.; RODRIGUES, M. L. A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* em estádios pré-parasitários de ciatostomídeos em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, p.113, 1995.

SANTÚRIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; DE LA RUE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; ALVES, S. H. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. **Veterinary Parasitology**, v.164, p. 344- 346, 2009.

SANYAL, P. K.; CHAUAN, J. B.; MUKHOPADHYAYA, P. N. Implications of Fungicidal Effects of Benzimidazole Compounds on *Duddingtonia flagrans* in Integrated Nematode Parasite Management in Livestock. **Veterinaru Research Communications**, v.28, n.4, p.375-385, 2004.

SAUMELL, C. A.; FERNÁNDEZ, A. S. Hongos nematófagos para el control biológico de nematódos parásitos de ruminantes. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.81, p.270-273, 2000.

SAUMELL, C. A.; PADILHA, T. Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata Region of Minas Gerais State, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.14, p. 63-70, 2000.

SCHILLHORN VAN VEEN, T. W. Methods for diagnosis of parasitism in small ruminants, **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 2, p. 335–344, 1986.

SCHILLHORN VAN VEEN, T. W. Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control. **Veterinary Parasitology**., v.71, p.177-194, 1997.

SCHOLLER, M.; RUBNER, A. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. **Microbiological Research**, v. 149, p. 145-149, 1994.

SILVA, A. S. et al. Técnicas parasitológicas adaptadas para quantificação de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* em fezes ovinas e na pastagem. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.2, p. 373 – 378, 2009.

STEAR, M. J., BISHOP, S. C., HENDERSON, N. G.; SCOTT, I. A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*. **Animal Health Research Reviews**, v. 4, p.45–52, 2003.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991, 282 p.

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.

SUAREZ, V. H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v.33, n.5, p. 563 – 573, 2002.

TERRIL, T. H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HSTED, S.; MILLER, J. E.; KAPLAN, R. M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvar 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.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**, 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996, 273p.

VAN OORSCHOT, C. A. N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, v.26, p.61-95, 1985.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 99-103. 1999.

WAGHORN, T. S., LEATHWICK, D. M.; CHEN, L. Y., SKIPP, R. A. 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**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p.11-14, 1998.

WALLER, P. J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General review. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 181-187, 1996.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science Technology**. v.126, n. 3-4, p. 277-289, 2005.

WALLER, P. J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematodes parasites of sheep: screening studies. **Veterinary Parasitology**, v.49, n.4, p. 285-297, 1993.

WALLER, P. J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D. R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v.51, n. 3-4, p. 289-299. 1994.

WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BØGH, H.O.; ILSØE, B. Na attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections in first year grazing calves. **Journal of Helminthology**. v. 68, p.175-180, 1994.

YEATES, G.W.; WALLER, P.J.; KING, K.L. Soil nematodes as indicators of the effect of management on grasslands in the New England Tablelands (NSW): effect of measures for control of parasites of sheep. **Pedobiologia**, v.41, p.537-548, 1997.