

ROGÉRIO OLIVA CARVALHO

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Ancylostoma* spp. E DE *Toxocara canis*
POR FUNGOS NEMATÓFAGOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C331c
2010
Carvalho, Rogério Oliva, 1975-
Controle biológico de *Ancylostoma* spp. e de
Toxocara canis por fungos nematófagos / Rogério Oliva
Carvalho. – Viçosa, MG, 2010.
xv, 68f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 56-68.

1. Cão - Doenças. 2. *Toxocara canis* - Controle
biológico. 3. *Ancylostoma* - Controle biológico. 4. Fungos
nematófagos. 5. Helminto - Controle biológico.

I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.


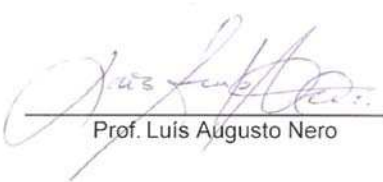
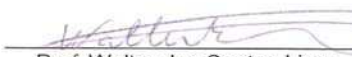

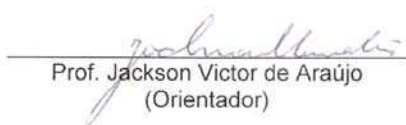
CDD 22.ed. 636.7089696

ROGÉRIO OLIVA CARVALHO

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Ancylostoma spp.* E DE *Toxocara canis* POR
FUNGOS NEMATÓFAGOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de março de 2010.

 Prof. Leandro Grassi de Freitas	 Prof. Luis Augusto Nero
 Prof. Walter dos Santos Lima	 Prof. Marcos Pezzi Guimarães
 Prof. Jackson Victor de Araújo (Orientador)	

“São duas coisas verdadeiramente diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância.”

Hipócrates.

A Deus.

A meu filho, Gabriel.

A minha esposa, Jackeline

Aos meus pais, Sadi e Luzia.

Aos meus irmãos e amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus, lhe agradeço por mais essa vitória.

A minha esposa Jackeline e meu filho Gabriel, por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, pela paciência nos meus dias de mau humor, pelos conselhos, pela alegria, pelo carinho, pelo seu amor, enfim, por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais, Sadi e Luzia, por terem compartilhado e alimentado meus ideais, incentivando-me a prosseguir nesta difícil jornada.

Aos meus irmãos e avós, seja pela presença, pela palavra, pelo sorriso ou pela simples lembrança que me deram coragem e determinação para traçar o caminho em busca dos meus objetivos.

Ao Professor Jackson, pela orientação, pela oportunidade, pela amizade e por ter acreditado em meu potencial.

Aos amigos Fabio R. Braga, André R. Silva, Juliana M. Araujo, Sebastião R. Ferreira, Luiza L. N. Frassy, Camila D. F. Alves e Alexandre O. Tavela, pelas sugestões, correções, conversas, amizade e colaboração no experimento.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, José Geraldo (Tuim) e Ademir, pela amizade e valiosa ajuda no experimento.

Ao co-orientador Laércio dos Anjos Benjamin pela ajuda e atenção para com meu trabalho.

A secretária da Pós-Graduação, Rosinéia (Rosi), pela atenção e gentileza nos diversos momentos que tive que incomodá-la.

A Clotilde B. Maestri da Sociedade Viçosense de Proteção aos Animais (SOVIPA), pela parceria no desenvolvimento do estudo a campo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária pela amizade e pelos conhecimentos que adquiri na graduação e pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões na elaboração final deste trabalho.

BIOGRAFIA

ROGÉRIO OLIVA CARVALHO, filho de Sadi Natalino Moraes Carvalho e Luzia Aparecida Oliva Carvalho, nasceu em 25 de novembro de 1975, Pirassununga - São Paulo.

Em janeiro de 2000, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária pelo Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em dezembro de 2004.

Iniciou em maio de 2006 o curso de Doutorado em Medicina Veterinária pelo Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sendo aprovado no exame de qualificação em 9 de novembro de 2009. Submetendo-se à defesa da Tese do Doutorado em 26 de março de 2010.

SUMÁRIO

	Pagina
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Prevalência dos Nematóides em Cães.....	2
2.2. <i>Ancylostoma</i> sp. em Cães.....	2
2.3. <i>Ancylostoma</i> sp. no Homem.....	4
2.4. <i>Toxocara canis</i> em Cães.....	5
2.5. <i>Toxocara canis</i> no Homem.....	7
2.6. Controle Biológico.....	8
2.7. Fungos.....	9
2.7.1. Fungos Endoparasitas.....	9
2.7.2. Fungos Produtores de Metabólitos Tóxicos.....	9
2.7.3. Fungos Oportunistas.....	10
2.7.4. Fungos Predadores.....	13
3. OBJETIVOS.....	17
CAPITULO 1 - Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of <i>Ancylostoma</i> sp.: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs.....	18
Abstract.....	19
1. Introduction.....	19
2. Material and methods.....	20
2.1. <i>In vitro</i> test.....	20
2.2. Passage test.....	21
3. Results and discussion.....	22
4. Conclusion.....	28
CAPÍTULO 2 - Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus <i>Monacrosporium thaumasium</i> in southeastern Brazil	29
Abstract.....	30
1. Introduction.....	30
2. Material and methods.....	31
3. Results.....	33
4. Discussion.....	36
5. Conclusion.....	37

CAPÍTULO 3 - Ovicidal Activity of <i>Pochonia chlamydosporia</i> and <i>Paecilomyces lilacinus</i> on <i>Toxocara canis</i> eggs.....	38
Abstract.....	39
1. Introduction.....	39
2. Materials and method.....	40
2.1. Organisms.....	40
2.2. <i>In vitro</i> test.....	41
3. Results.....	42
4. Discussion.....	46
5. Conclusion.....	47
CONCLUSÕES GERAIS.....	48
APÊNDICE.....	49
Metodologia.....	49
REFERÊNCIAS	56

LISTA DE TABELAS

Pagina

CAPITULO 1

Table 1 – Daily mean of non-predated infective *Ancylostoma* sp. (L₃) larvae per 4-mm diameter field, on 2% water-agar medium, during 10 days, for treatments with fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. clododes* (CG719), *A. robusta* (I-31) and control group (without fungi).

23

Table 2 – Means for the number of *Ancylostoma* sp. infective larvae recovered from plates prepared with dog feces and sampled at 8, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hours after the treatment with 1g mycelium/ kg of live weight, with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Arthrobotrys robusta* (I-31) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), and control (without fungi).

25

CAPITULO 2

Table 1 – Monthly means of Eggs per gram of faeces (EPG) counts and Coprocultures of *Ancylostoma* sp. and standard deviation (\pm) of the group of animals treated with *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a), with 0.5g of mycelium per Kg of live weight and control group without fungi between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

34

Table 2 – Monthly means and standard (\pm) deviation of *Ancylostoma* sp. infective larvae recovered from kennel soil for animals treated with *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a), with 0.5g of mycelium per Kg of live weight and kennel soil of control group without fungi, between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

35

CAPITULO 3

Table 1 – Means and standard deviations of the ovicidal activity (types 1, 2 and 3 effects) of egg-killing fungi *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and CV4) and *Paecilomyces lilacinus*, and of the control group with fungi on embryonated *Toxocara canis* eggs on the 7th, 14th and 21st days of interaction.

43

LISTA DE FIGURAS

Pagina

CAPITULO 1

Fig. 1. Means and standard deviation (bars) of infective non-predated *Ancylostoma* sp. larvae recovered from 2% water-agar plates by the Baermann method on the tenth day of treatment with the following fungal isolates: *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. clododes* (CG719), *A. robusta* (I-31) and a control group (without fungi). Means followed by at least one common capital letter in the row are not significantly different by the Tukey's test at a 5% probability level.

24

Fig. 2. Linear regression curves of *Ancylostoma* sp. infective larvae (L₃), recovered from 2% water-agar plates (5 cm in diameter) incubated at 25°C for 15 days with the isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001, Δ , —, $y = 9.8941 + 0.1448 * h$, $R^2 = 0.6327$), *Arthrobotrys robusta* (I-31, \times , — —, $y = 10.1407 + 0.0871 * h$, $R^2 = 0.5960$), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a, \circ , - - -, $y = 13.6431 - 0.0174 * h$, $R^2 = 0.0515$) and control (without fungi, \square , — - -, $y = 25.280 + 0.0185 * h$, $R^2 = 0.0203$) as a function of time (8 to 96 hours).

27

CAPITULO 2

Fig. 1. Monthly averages of rainfall (mm³) and medium temperatures (°C) between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

33

CAPITULO 3

Fig.1. Means and standard deviations (bar) of the larvaed *Toxocara canis* eggs observed on the 21st day of interaction, in the groups that have *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* (PL) and in the control group without fungi. Percentages followed by the same small letters were not significantly different ($P<0.01$) by the Friedman Test.

44

Fig. 2. (a) Embryonated *Toxocara canis* egg in the control group, without fungus (40x). (b). Larvaed *Toxocara canis* egg in the control group (40x). (c) *T. canis* egg hatched by the action of *P. chlamydosporia* isolate VC4 (40x). (d) *T. canis* egg hatched by the action of *P. chlamydosporia* (VC4) with release of the larva (40x). (e) Egg hatched by the action of *P. lilacinus* with content release (40x). (f) Predated egg (type 3 effect) by *P. chlamydosporia* isolate VC1 (white arrow), and presence of chlamydospores (black arrow) (40x).

45

RESUMO

CARVALHO, Rogério Oliva, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Controle biológico de *Ancylostoma* spp. e de *Toxocara canis* por fungos nematófagos**. Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientadores: Laércio dos Anjos Benjamin e Artur Kanadani Campos.

O convívio do homem com cães e gatos não se limita a uma situação de coabitação familiar. Estes animais freqüentam também áreas públicas de lazer destinadas à população humana e, com freqüência, defecam nestes locais. Fezes de animais parasitados, depositadas no ambiente podem tornar o solo contaminado com ovos e larvas de helmintos, os quais muitas vezes são agentes de várias zoonoses, com destaque para o *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* sp. pelo potencial zoonótico e por serem os mais prevalentes. O controle do estágio adulto destes nematóides é baseado na utilização de anti-helmínticos, no entanto, o uso de agentes biocontroladores pode ser uma medida complementar reduzindo a população dos estágios pré-parasitários em desenvolvimento no solo. Dentre os organismos biocontroladores, sabe-se que os fungos nematófagos têm tido eficácia contra os nematóides de animais domésticos. A fim de determinar o melhor fungo para o controle do *Ancylostoma* spp., sete isolados de fungos predadores de nematóides, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. cladodes* (CG719) e *A. robusta* (I-31) foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade de predação de larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma* spp. Os isolados AC001, I-31 e NF34a mostraram mais eficazes na captura das L₃ de *Ancylostoma* spp. no teste *in vitro* e em seguida foram avaliados *in vivo* quanto à capacidade de suportar a passagem pelo trato gastrintestinal de cães, sem perda da habilidade de predação de L₃ de *Ancylostoma* spp. Os isolados fúngicos sobreviveram à passagem e foram eficientes em predação das L₃ nas primeiras 48h de coleta das fezes (P<0,05), após este período apenas o isolado NF34a manteve eficaz até o tempo de 96 h de coleta (P<0,05) e foi utilizado no teste *in vivo*. Com o objetivo de avaliar a eficácia do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34a) no controle biológico da *ancilostomose* de cães, doze animais adultos foram divididos em dois grupos formando um grupo controle (sem tratamento fúngico) e um grupo tratado com 0,5g de micélio fúngico por quilograma de peso vivo, duas vezes por semana (segunda e quinta-feira), durante seis meses. A cada 15 dias foram coletadas amostras de solo em cada canil, para a pesquisa das larvas infectantes (L₃) no período de março a setembro de 2008. A

partir de junho até o final do experimento (setembro) as médias de L₃ recuperadas no solo do canil controle foram maiores do que as médias do canil tratado ($p>0,05$), comprovando a ação do fungo *M. thaumasium* sobre as larvas do solo, podendo servir como uma alternativa de controle ambiental do *Ancylostoma* spp. de cães. Para determinar o melhor fungo no controle do *Toxocara canis*, foi avaliada a atividade ovicida, *in vitro*, dos fungos oportunistas *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) e *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Toxocara canis*. Todos os isolados fungicos apresentaram atividade ovicida (efeito tipo 3) sobre ovos de *T. canis* e são promissores candidatos a controladores biológicos deste helminto.

ABSTRACT

CARVALHO, Rogério Oliva, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2010.
Biological control of *Ancylostoma* spp. and of *Toxocara canis* by nematophagous fungi
Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-Advisers: Laércio dos Anjos Benjamin and Artur Kanadani Campos.

The interaction of man with dogs and cats is not limited to a situation of cohabitation family. These animals also frequent public areas and leisure for the human population and often defecate on these sites. Feces of infected animals, deposited in the environment may become contaminated soil with eggs and larvae of parasitic worms, which often are agents of zoonosis, especially *Ancylostoma* spp. and *Toxocara* sp. because they are zoonotic and are most prevalent in dogs. The control of the adult stage of these nematodes is based on the use of anti-helminthic; however, the use of biocontrol agents may be an additional measure reducing the population of preparasitic stages in development in the soil. Among the biocontrol organisms, it is known that nematode-trapping fungi have been effective against nematodes of domestic animals. In order to determine the best fungus for control of *Ancylostoma* spp., the predatory capacity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. cladodes* (CG719) and *A. robusta* (I-31) on infective *Ancylostoma* spp. larvae (L₃) was evaluated. Isolates AC001, I-31 and NF34a were more effective in capturing L₃ during the in vitro assay. Isolates were then in vivo evaluated for the capacity to remain viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs, while still maintaining their predatory activity against L₃. Fungal isolates survived the passage and showed efficient predation 48 h after fungal administration to the dogs (P<0.05). After this time, only the isolate NF34a remained effective up to 96h after administration (P<0.05) and was used in the in vivo test. In order to evaluate the efficiency of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a) in the biological control of dog hookworm, 12 adult animals, average weight between 7 and 19 kg, were separated into groups and kept in 2 different kennels: control group (without fungus) and a group treated with 0.5 g of fungal mycelium per kilogram of body weight, during six months, twice a week (Monday and Thursday). Every 15 days soil samples were collected from each group and examined for infective larvae (L₃) in the period between March and September 2008. From June to the end of the experiment (September), means of L₃ recovered from the kennel soil of the control group

were higher than the means of the kennel soil of the treated group ($p>0.05$), confirming the action of *M. thaumasium* against larvae in the soil, and can be therefore considered as an alternative environmental control of *Ancylostoma* spp. in dogs. In order to determine the best fungus for control of *Toxocara canis*, an assessment was made of the ovicidal activity of egg-parasitizing fungi *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs in vitro. All the fungal isolates showed ovicidal activity (type 3 effect) on *T. canis* eggs and can be considered a potential candidate to biological controller of those nematodes.

1. INTRODUÇÃO

Os cães encontram-se representados na história como animais domésticos desde o início da civilização, sendo considerados os animais de estimação que mais convivem com o homem (LEITE *et al.*, 2004). A ligação emocional proporcionada por este convívio pode trazer benefícios físicos e psicológicos, além de melhorar a integralização social de portadores de doenças imunossupressoras, idosos, crianças e pessoas com necessidades especiais (MCNICHOLAS *et al.*, 2005). O crescente número de cães domiciliados, peridomiciliados e errantes, nas áreas urbanas, associado ao fácil acesso destes animais a locais de lazer, aumenta o risco de infecção por zoonoses (Gennari *et al.*, 1999; Robertson e Thompson, 2002).

Na população humana, crianças, mulheres grávidas e pessoas imunocomprometidas (aidéticos, transplantados e idosos), são considerados os grupos que apresentam maior risco de adquirirem zoonoses. (Robertson *et al.*, 2000).

Alguns helmintos intestinais de cães e gatos, como o *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* spp., têm requerido grande atenção pelo seu potencial zoonótico (Robertson e Thompson, 2002), consequência direta da contaminação do solo com fezes de animais portadores. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são infectadas por meio do solo, sugerindo, portanto que a contaminação ambiental é um importante indicador do risco da população humana de contrair estas infecções (Crompton, 1999).

É importante que métodos para prevenção e controle dos parasitas sejam implantados a fim de reduzir a contaminação ambiental com ovos infectantes e larvas (Labarthe *et al.*, 2004).

Muitos organismos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros, são tidos como parasitas de helmintos de animais domésticos (Gronvold *et al.*, 1996a; Mota *et al.*, 2003), podendo ser uma alternativa no controle de nematóides parasitas de pequenos animais. Dentre estes microrganismos, destacam-se os fungos predadores de nematóides dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium*, já comprovados como potenciais agentes no controle de nematóides parasitas de animais (Araújo *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2003).

A aplicação de fungos no biocontrole de nematóides parasitos vem auxiliar o controle químico e deveria ser feita não só em condições em que ocorre previsão de maior

infestação do ambiente por ovos e larvas de helmintos, mas, também, quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente, prevenindo, com isso, o parasitismo clínico e fornecendo uma quantidade de larvas suficiente aos animais para provocar o desenvolvimento de uma imunidade adquirida naturalmente (Waller e Larsen, 1993).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Prevalência dos Nematóides em Cães

Os principais helmintos de interesse médico veterinário podem ser divididos em dois filos: o Filo Nematelminthes, que compreende os nematódeos, e o Filo Platyhelminthes, formado pelos cestódeos e trematódeos. Os cães são parasitados por cerca de 17 espécies de trematóides, 17 de cestóides, 20 de nematóides e 1 acantocéfalo (Katagiri e Oliveira-Siqueira, 2007).

As helmintoses constituem um grave problema na clínica de cães e gatos pela sua alta prevalência, sendo, algumas delas, consideradas zoonoses (Ribeiro, 2004).

Estudos baseados em exames fecais de cães, na cidade de São Paulo, mostraram que o *Ancylostoma* spp e o *Toxocara canis* são as espécies de parasitas mais frequentemente encontradas (Gennari et al., 1999; Oliveira-Sequeira et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados por Labruna et al. (2006) em Monte Negro (RO), Blasius et al. (2005) em Itapema (SC), Castro et al. (2005) em Praia Grande (SP).

O predomínio de *Ancylostoma* sp. e *T. canis* infectando cães também foi observado em outros países como no Peru (Altamirano et al., 2003), no México (Campos e Alarcón, 2002) e na Venezuela (Ramirez-Barrios et al., 2004).

No Brasil, a infecção por ancilostomatídeos em cães e gatos é muito comum, sendo os mais prevalentes o *A. caninum* e o *A. brasiliense*, parasitando cães e gatos, respectivamente (Cury e Lima, 2002). Embora, os cães possam se infectar com o *A. brasiliense* e os gatos com o *A. caninum* (Freitas, 1980; Cury e Lima, 2002).

2.2. *Ancylostoma* sp. em Cães

Os cães podem adquirir o *A. caninum* por via oral, percutânea, transplacentária e por via lactogênica ou colostrálica. Estudos mostram que o *A. brasiliense* não apresenta transmissão por via lactogênica e nem a transplacentária (Soulsbly, 1982).

A via oral se dá pela ingestão de larvas de terceiro estágio (L₃) presentes no solo ou em insetos, como as baratas que funcionam como vetor mecânico (Prociv e Croese, 1990). Após a ingestão, as L₃ penetram nas glândulas gástricas ou intestinais, onde, após alguns dias desenvolvem-se para larvas de quarto estágio (L₄), retornam à luz intestinal e terminam o seu desenvolvimento para vermes adultos, não apresentando ciclo sistêmico (Soulsby, 1982).

Na via percutânea as L₃ penetram principalmente pela pele dos coxins (Mittra et al., 1984) com o auxílio de uma enzima semelhante à colagenase, que destrói a membrana basal da pele e transforma a proteína em uma glico-proteína solúvel. Ao penetrarem na pele, as L₃ atingem os capilares e migram pela circulação sanguínea até os pulmões onde mudam para L₄, migram pelas vias respiratórias, com o auxílio dos movimentos ciliares, até a faringe, são deglutidos e chegam ao intestino delgado onde terminam seu desenvolvimento para vermes adultos (Freitas, 1980).

Segundo Velho et al. (2003) a infecção percutânea se deve ao tropismo das L₃ pela alta concentração de dióxido de carbono do tecido epitelial animal e humano. As L₃ que seguiram uma rota migratória somática na infecção percutânea ficam em latência no tecido muscular de cães sensibilizados por infecções anteriores sobrevivendo por até 240 dias, no caso da espécie *A. caninum* (Soulsby, 1982).

Em cadelas, elas são reativadas durante o estro e no final da gestação podendo auto-infectar endogenicamente a fêmea ou infectar a prole intra-uterinamente via placenta e lactogenicamente via glândula mamária (Soulsby, 1982; Fortes, 2004).

A patogenicidade do *A. caninum* está diretamente relacionado à sua atividade hematófaga, podendo causar perda sanguínea diária de 0,01 a 0,2 mililitros por cada verme adulto. Em comparação com o *A. caninum*, a perda de sangue causada pelo parasitismo do *A. braziliense*, 0,001 mililitro por verme adulto, é praticamente insignificante, sendo considerado de baixa patogenicidade (Burrows et al., 1995).

Além da anemia, os cães podem apresentar diarreia, enterite hemorrágica, vômito, depressão e perda de peso, podendo levar à morte, (Freitas, 1980; Burrows et al., 1995). As larvas de 3º estágio ao penetrarem na pele produzem lesões pruriginosas (Cury e Lima, 2002). Os animais podem ainda apresentar pneumonia, pela migração das L₄ pelos pulmões (Burrows et al., 1995).

2.3. *Ancylostoma* sp. no Homem

O homem adquire o *A. caninum* e o *A. braziliense* principalmente pela pele (larvas de 3º estágio), mas, pode se infectar por via oral (Freitas, 1980).

As áreas públicas, como parques e praças, são os principais locais de contaminação humana, sendo as crianças as mais acometidas por estarem mais expostas, ao brincarem com o solo destes locais, que podem estar contaminados (Mccarthy e Moore, 2000; Santarém et al., 2004).

No homem, o *A. braziliense* e o *A. caninum* são responsáveis pela patologia denominada “larva migrans cutânea”, caracterizada por erupções lineares serpiginosas progressivas que se prolongam pelo tecido subcutâneo, causado pela migração das larvas de terceiro estágio destes vermes (Araújo et al., 2000; Mccarthy e Moore, 2000; Brenner e Patel, 2003).

A larva migrans cutânea é mais freqüente em regiões tropicais e subtropicais, apresentando um pico de ocorrência durante o verão (Robertson e Thomson, 2002). Sua ocorrência está relacionada a populações pobres com baixas condições sanitárias. No Brasil, o nordeste é considerado uma região endêmica, apresentando uma incidência anual de 1.841 casos para cada 10.000 habitantes, sendo mais alta do que a incidência de muitas outras doenças (Heukelbach et al., 2003).

Além da larva migrans cutânea os indivíduos acometidos pelo *A. caninum* podem desenvolver um quadro de enterite eosinofílica (Mccarthy e Moore, 2000), caracterizado histologicamente por uma inflamação transmural com edema e intenso infiltrado eosinofílico (Prociv e Croese, 1990). O desenvolvimento da enterite está associado principalmente à contaminação pela via oral (Robertson et al., 2000). Os indivíduos acometidos por esta enterite apresentam anorexia, náuseas, diarreia e ocasionalmente podem desenvolver um quadro de “abdômen agudo”, caracterizado pelo aparecimento súbito com severa dor abdominal, mimetizando um quadro de apendicite aguda. Porém, está associado com eosinofilia e aumento dos níveis de imunoglobulina do tipo E (IgE) (Prociv e Croese, 1996). O *A. duodenale* e o *Necator americanus*, não causam enterite eosinofílica, mas podem induzir infiltrado eosinofílico menos intenso no trato gastrointestinal (Prociv e Croese, 1990).

Na Austrália, 233 pessoas suspeitas com dor abdominal (com ou sem eosinofilia) foram testadas pelo teste de Western Blot dando todas positivas para *Ancylostoma caninum*, sendo que dessas, quase todas eram proprietárias de cães. Os estudos realizados

em torno dessa zoonose, indicam que ela é sub-diagnosticada, sendo muito mais distribuída do que se acredita atualmente. Existem relatos de infecção entérica em humanos devido ao *A. caninum*, também na América do Sul, Filipinas, Israel e União Européia (Mccarthy e Moore, 2000).

Em raros casos, a larva de *Ancylostoma* sp. pode invadir as vísceras e causar a síndrome de Loeffler's (Heukelbach et al., 2004) caracterizada por um infiltrado pulmonar e eosinofilia periférica, causados pela reação de hipersensibilidade durante a migração pulmonar de larvas de helmintos ou por um processo imunológico sistêmico (Del Giudice et al., 2002).

2.4. *Toxocara canis* em Cães

Para que se tornem infectantes, os ovos de *Toxocara* sp. necessitam de um período de incubação que varia de duas a seis semanas (Gillespie, 1988). Após cair no solo, em condições favoráveis de oxigenação, temperatura e umidade, no interior dos ovos ocorre o desenvolvimento de uma larva que evolui até o estágio infectante (L₃) (Cury e Lima, 2002; Ribeiro, 2004). Portanto, solos com vegetação abundante, fornecem condições de umidade e sombra formando um microclima favorável ao desenvolvimento e conservação dos ovos de *Toxocara* sp. na superfície do solo, por muito tempo. Em contra partida, os ovos deste parasito desenvolvem-se mal ou são destruídos em pouco tempo em solos expostos a ação dos raios solares e sem a umidade necessária para sua conservação (Chávez et al., 2000; Pérez et al., 2000).

Os cães adquirem o *T. canis*, por via oral, pela ingestão de ovos contendo L₃ ou predando roedores, répteis e pássaros que podem se infectar e servir como hospedeiro paratênico. Nestes animais (hospedeiros paratênicos), após a ingestão dos ovos larvados, as larvas penetram na mucosa intestinal e migram entre a lamina própria e a muscular da mucosa podendo atingir os linfonódos mesentéricos via vasos linfáticos ou cair na cavidade peritôneal indo se alojar em vários órgãos, podendo ser encontrado no fígado, pulmão, cérebro, nos olhos e em músculos, especialmente o diafragma e a língua (Aldawek et al., 2002; Taira et al., 2004).

Pode também ocorrer a transmissão transplacentária e lactogênica (Gillespie, 1988; Cury e Lima, 2002). Nos cães, após a ingestão dos ovos contendo as larvas infectantes, no intestino delgado, a larva eclode, penetra na parede intestinal e alcança a circulação sanguínea, atinge o sistema porta hepático e posteriormente os pulmões, onde muda para

larvas de quarto estágio (L₄). A L₄ alcança os brônquios, é expectorada, deglutida e no intestino delgado evolui para a forma adulta (Freitas, 1980; Cury e Lima, 2002).

A partir da quinta semana de vida os cães começam a desenvolver uma resistência ao parasitismo, que se completa por volta dos seis meses de idade. Durante este período de transição, vai diminuindo gradativamente a quantidade de larvas que consegue completar seu desenvolvimento, até a maturidade sexual, no intestino delgado (Freitas, 1980). Em cães acima de seis meses, a maioria das larvas ingeridas atravessa a rede pulmonar e continua na circulação arterial, de onde são transportadas para vários tecidos (músculos, glândula mamária e rins) onde ficarão em latência (Freitas, 1980; Cury e Lima, 2002).

Em fêmeas gestantes, a partir do 42º dia, por ação hormonal, as larvas em latência são reativadas e, por via transplacentária, infectam o feto. Neste as larvas ficam no fígado e após o nascimento, pela rota hepatopulmonar, alcançam o intestino delgado onde se desenvolvem para vermes adultos. Nem todas as larvas passam para o feto, algumas podem continuar em latência e infectar fetos de gestações subseqüentes (Freitas, 1980; Cury e Lima, 2002). As larvas que alcançam a glândula mamária passarão ao neonato durante a lactação (Cury e Lima, 2002). Os cães de três semanas de idade já eliminam ovos nas fezes (Freitas, 1980; Cury e Lima, 2002).

Devido à queda da imunidade, provocada pela gestação, o ciclo pode se completar novamente em cadelas adultas, que passam a eliminar ovos nas fezes (Cury e Lima, 2002). Cada fêmea adulta de *T. canis* pode eliminar até 20.000 ovos por dia durante um período de 6 meses (Gillespie, 1988).

Normalmente os cães apresentam infecção inaparente, entretanto, os sinais podem ser moderados a severos em animais jovens, nos quais os vermes adultos no intestino delgado podem causar diarreia, distensão abdominal, desidratação e retardo no crescimento, pela ação espoliadora, alimentando-se de aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Ocasionalmente, grandes infecções podem levar à morte por obstrução, intussuscepção ou perfuração intestinal (Burrows et al., 1995). A pneumonia associada à migração traqueal pode causar a morte de filhotes, 48 a 72 horas após o nascimento (Cury e Lima, 2002).

2.5. *Toxocara canis* no Homem

Nos EUA a toxocarose humana é descrita como a mais comum infecção parasitária zoonótica adquirida através de animais de estimação (Robertson e Thomson, 2002).

A toxocarose é causada pela ingestão de ovos larvados presentes no solo, principalmente em praças, parques públicos (Santarém et al., 1998; Chávez et al., 2000) e caixas de areia de escolas (Nunes et al., 2000). O consumo de carnes frescas ou mal cozidas também pode representar um risco de infecção, pois, muitos animais podem servir de hospedeiros paratênicos como frangos (Nagakura et al., 1989; Taira et al., 2004), porcos (Sturchler et al., 1990; Taira et al., 2004) e cordeiros (Salem e Schantz, 1992).

No homem, as larvas de *T. canis* migram pelos tecidos causando uma doença conhecida por “larva migrans visceral”, na qual os indivíduos apresentam febre, leucocitose com eosinofilia, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, sinais respiratórios e lesões oculares (granulomatose retinal) (Robertson e Thomson, 2002).

Há três formas clínicas descritas de toxocarose: a larva migrans visceral (LMV), a larva migrans ocular (LMO) e a forma oculta (subclínica ou assintomática) da toxocarose (Inan et al., 2006).

Na LMV, os sinais clínicos variam de leve a severos dependendo de diversos fatores como o número de ovos infectantes ingeridos, a quantidade de larvas migrantes, tecidos e órgãos afetados, frequência de reinfestação e resposta imunológica induzida pelo organismo, podendo apresentar-se em semanas a meses depois da infecção (Guardis et al., 2002). Assim como nos animais que funcionam como hospedeiros paratênicos, exames patológicos de biopsias do fígado de pessoas que apresentam quadro de LMV revelam a presença de áreas de inflamação granulomatosa ricas em eosinófilos, com necrose e presença de larvas de *Toxocara* sp. (Inan et al., 2006).

As crianças constituem o grupo de maior risco, pela ingestão de solo (geofagia) que pode estar contaminado com ovos larvados (Cháves et al., 2000). Quando infectadas, as crianças podem apresentar hiperatividade, incoordenação motora, epilepsia e outras alterações neurocomportamentais (Schantz, 1991).

A LMO resulta da migração das larvas para os olhos, podendo causar coriorretinite, uveíte, estrabismo e até cegueira. Ocorre geralmente em crianças acima de 4 anos de idade e em adultos sem outros sinais clínicos, com baixos níveis de anticorpos e níveis normais de eosinófilos (Guardis et al., 2002; Inan et al., 2006).

Na toxocarose assintomática, os indivíduos infectados apresentam-se positivos para a presença de anticorpos anti-*Toxocara* (IgG ou IgM). Sendo que as crianças apresentam uma soro-prevalência maior do que os adultos (Fenoy et al., 1996).

Aguiar-Santos et al. (2004), pesquisando a presença de anticorpos anti-*Toxocara canis* (IgG) em 386 crianças e adolescentes na cidade de Recife, Brasil, obtiveram uma frequência de 39,4% positivos, sendo que destes, 60% eram crianças com 6 a 10 anos de idade. Essa frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em crianças com idade entre 5 e 10 anos foi também descrito por Chieffi et al.(1990) em um estudo realizado na cidade de Santos, no estado de São Paulo. A alta frequência de anticorpos anti-*Toxocara* foi observada também em outras cidades do Brasil, como em Vitória, no Espírito Santo (Moreira-Silva et al., 1998) e em Campo Grande, no Mato Grosso do Sul (Matos et al., 1997). Sendo observado também em outros países como na Venezuela (Lynch et al., 1988) e na França (Gueglio et al., 1994).

2.6. Controle Biológico

Normalmente o termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limiar subclínico e economicamente aceitável a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola. Na prática, o controle biológico não atua sobre estádios internos de parasitos. Contudo, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estádios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para o hospedeiro final. Além disso, causam menos efeitos negativos ao ambiente que os métodos químicos (Gronvold et al., 1996a).

Diferentes microrganismos têm sido relatados como antagonistas de nematóides. Entre os vários grupos de microrganismos que utilizam nematóides como fontes de nutrientes temos protozoários, turbelários, tardígrados, oligoquetas, insetos, ácaros, nematóides, vírus, bactérias e fungos (Mankau, 1980; Lisek e Nigenda, 1989; Stirling, 1991; Waller e Larsen, 1993; Gronvold *et al.*, 1996a). A maioria dos organismos estudados permanece como curiosidades e somente algumas espécies de fungos e bactérias demonstram ter potencial para utilização em programas de controle biológico de nematóides (Mendoza-de-Gives, 1999).

Os fungos nematófagos são antagonistas dos nematóides, presentes naturalmente no ambiente, são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais, solos agricultáveis e em todos os

tipos de matéria orgânica em decomposição. (Graminha, 2004). Podendo ser isolados do solo (Dias *et al.*, 1995), de fezes frescas coletadas diretamente do reto de animais (Manuelli *et al.*, 1999), ou nos bolos fecais em decomposição (Saumell e Padilha, 2000), apresentando grande potencial para o controle biológico de parasitas de plantas e animais (Stirling e Smith, 1998; Araújo, 1999).

2.7. Fungos

Os fungos podem ser classificados de acordo com seu modo de ação nos seguintes grupos: predadores, oportunistas (parasitos de ovos e de fêmeas de nematóides parasitas de plantas), endoparasitas e produtores de metabólitos tóxicos aos nematóides (Mankau, 1980; Jatala, 1986; Morgan-Jones e Rodrigues-Kabana, 1987).

2.7.1. Fungos Endoparasitas

Os fungos endoparasitas persistem no ambiente principalmente como esporos e algumas vezes como clamidósporos liberados no solo a partir de nematóides desintegrados (Gray, 1987). A infecção pode ocorrer através da adesão do esporo à cutícula do nematóide ou através da ingestão. Ocorre então, a germinação do esporo que se difunde pela cavidade corpórea do nematóide, cresce e absorve o conteúdo do nematóide. Não há desenvolvimento de extensas hifas para o exterior do corpo dos nematóides infectados, mas apenas produção de tubos de liberação de esporos ou de conidióforos e conídeos (Barron, 1977, Mota *et al.*, 2003). Estes fungos, com poucas exceções, são parasitos obrigatórios, de difícil cultivo *in vitro* e, portanto, pouco práticos para serem utilizados em programas de controle biológico de nematóides (Waller e Larsen, 1993).

2.7.2. Fungos Produtores de Metabólitos Tóxicos

Algumas espécies de fungos podem produzir metabólitos tóxicos aos nematóides (Nordbring-Hertz, 1988) Tais substâncias podem afetar a motilidade, a capacidade de penetração no hospedeiro, a atração pelo hospedeiro, a eclosão dos ovos ou causar a morte desses parasitas (Kerry *et al.*, 1984, Costa, 2000). Podendo atuar como moléculas nematostáticas ou nematicidas (Hallman e Sikora, 1996). . Fungos do gênero *Pleurotus* liberam substâncias denominadas nematotoxinas produzidas por células secretoras

encontradas em intervalos ao longo das hifas, imobilizando nematóides (Barron e Thorn, 1987).

Há, ainda, fungos como o *Fusarium equiseti* que aparentemente não interagem diretamente com nematóides fitoparasitas, mas são capazes de produzir substâncias com propriedades nematicidas (Chen *et al.*, 2000). Pesquisadores estudam a utilização destas toxinas no controle de fitonematoídes (Costa *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002).

2.7.3. Fungos Oportunistas

Os fungos parasitos de ovos são saprófitas e, portanto, independe da presença de ovos no solo para sua sobrevivência sendo por isso facilmente cultivados em laboratório. Estes fungos penetram em ovos de helmintos e nematóides fêmeas parasitas de plantas através de hifas vegetativas, por ação mecânica, associado ou não à liberação de exoenzimas, como quitinase e protease produzidas pelo *Verticillium* sp. e *Paecilomyces* sp. (Nordbring-Hertz, 1988).

Suas hifas penetram a casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada quitínica e lipídica adjacente. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina torna vacuolizada e a camada de lipídios torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (Araújo *et al.* 2004; Ciarmela *et al.*, 2002).

De acordo com Lysek e Nigenda (1989), os fungos com capacidade ovicida podem ser divididos, em dois grupos, de acordo com o modo de ação sobre os ovos. No primeiro grupo, os fungos produzem metabólitos que agem nos embriões sem modificar a aparência morfológica da casca dos ovos. No segundo grupo, os fungos segregam um exoenzima que inicialmente ataca a casca do ovo e subsequenteiramente destroem o embrião, neste grupo, as hifas do fungo penetram no ovo ativamente e atacam o embrião.

O parasitismo de ovos por fungos é um importante fenômeno biológico que tem nas espécies *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* seus principais representantes com significativa atividade ovicida (Lysek e Sterba, 1991).

As espécies do gênero *Pochonia* são encontradas no solo em várias regiões do mundo, podendo ser isoladas diretamente do solo ou de ovos e cistos de fitonematóides (Zare e Gams, 2004; Sun et al., 2006). A espécie *P. chamydosporia* é a mais estudada e está associada, freqüentemente, à presença de matéria orgânica nos solos (Zare e Gams, 2004).

Segundo Kerry e Bourne (2002) o fungo *P. chamydosporia* reduz a população de fitonematóides por meio da colonização das massas de ovos, que ficam expostas na superfície do sistema radicular das plantas, causando a morte do embrião ou de formas juvenis de segundo estágio. Além disso, apresenta a vantagem de produzir clamidósporos, estruturas de resistência e sobrevivência, que são preferencialmente utilizados como inóculo, podendo ser adicionados ao solo em suspensão aquosa sem fonte adicional de nutrientes.

O fungo *P. lilacinus* é um hifomiceto da ordem Moniliales distribuído por todo o mundo, com maior freqüência em regiões quentes (Santiago et al, 2006). Caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematóides, destruindo o embrião, podendo exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e posteriormente mortas (Dunn et al., 1982). No Brasil, existem registros de *P. lilacinus* em diferentes tipos de solo, cultivados ou não, em profundidades variáveis de 0-40cm ou mais (Santiago et al, 2006). É um parasita facultativo de ovos de nematóides que pode crescer rapidamente "in vitro" e a sua sobrevivência no solo não depende da presença dos nematóides (Carneiro, 1992).

O uso de fungos oportunistas no controle dos ovos de helmintos que acometem os animais foi pouco estudado, mas, o *Paecilomyces lilacinus* mostrou atividade ovicida sobre ovos de *T. canis* (Araújo et al., 1995; Basualdo et al., 2000), sobre oncosferas de *Taenia hydatigena* (Ciarmela et al., 2005) e sobre ovos de *Taenia saginata* (Braga et al., 2008a). O fungo *Pochonia chlamydosporia* apresentou bons resultados *in vitro* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Braga et al., 2007), *Ascaris suum* (Araújo et al., 2008), *Fasciola hepática* (Braga et al., 2008b) e ovos de *T. saginata* (Araújo et al., 2009).

É um grupo bastante promissor para ser empregado no controle biológico de helmintos, principalmente porque reduzem em cerca de 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo (Ciarmela et al., 2000). Entretanto, muitas vezes o que impede sua plena eficácia é a estratégia desenvolvida pelos parasitos. A maioria desses helmintos parasitos gastrintestinais produz ovos que rapidamente darão origem a larvas, dificultando seu processo de interação com os ovos (Jansson e Nordbring-Hertz, 1988).

Após um longo estudo de observação, Lysek (1976) estabeleceu um método qualitativo para classificar a atividade ovicida. Esse método primeiramente proposto sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, determina que, o mecanismo de ação de um fungo oportunista está baseado em três tipos básicos de atividade ovicida, com sete subtipos: (1) fisiológica, com efeito bioquímico sem danos morfológicos a casca do ovo, (2) efeito bioquímico lítico, com alteração morfológica progressiva da casca do ovo e danos ao embrião e (3) efeito lítico e morfológico, com penetração do ovo, ataque e morte ao embrião. Em reação à sua subdivisão segue-se: (1a) onde o fungo irá inibir o desenvolvimento embrionário com início da sua atividade ovicida, é reconhecido como um efeito temporário; (1b) os metabólitos do fungo proporcionarão um desenvolvimento anormal das larvas com número aberrante de cromossomos; (2a) ocorrerá a desintegração e remoção enzimática da casca do ovo, e após excessivas lesões dará início à fase de penetração e danos ao embrião; (2b) acontecerá uma mudança na permeabilidade da casca, modificação da barreira osmótica e por consequência vacuolização e desintegração do embrião; (3a) o micélio do fungo penetrará em apenas um local da casca intacta do ovo, e promoverá um ataque e cessamento no desenvolvimento do embrião; (3b) o micélio do fungo penetrará em vários locais da casca promovendo a destruição do embrião e (3c) os fungos iniciarão o processo de ataque enzimático e conseqüentemente morte ao embrião.

A classificação da atividade ovicida atualmente foi simplificada e é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca, onde são visualizadas as hifas aderidas à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo (Lysek e Nigenda, 1989; Lysek e Sterba, 1991).

Na maioria das vezes, se observa que o tipo de atividade ovicida encontrada sobre os ovos dos parasitos é uma mistura dos efeitos dos tipos 2 e 3, mas, a classificação de um fungo como espécie ovicida somente acontece se este apresentar durante o processo de infecção dos ovos o efeito do tipo 3 (Lysek et al., 1982).

Os ovos nos estágios iniciais de desenvolvimento serão mais facilmente penetrados do que aqueles em estádios mais maduros, contendo formas juvenis. A eficiência do fungo parasita de ovos está relacionada ao estágio do ciclo de vida do hospedeiro em que corre o ataque, da agressividade e especificidade do fungo (La Mondia e Brodie, 1984).

2.7.4. Fungos Predadores

Os fungos predadores são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois são capazes de reduzir efetivamente populações de nematóides em condições de laboratório e no campo (Larsen, 1999). Estes fungos possuem grande variação na sua capacidade predatória sobre nematóides, mas são os mais frequentemente isolados, apresentando facilidades de cultivo em laboratório e maior potencial de comercialização. Além disso, a resistência à passagem pelo trato gastrointestinal 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, 1999).

Estes fungos crescem no solo como saprófitas podendo desenvolver sofisticadas adaptações morfológicas, ao longo das hifas, para capturar nematóides de vida livre (Nodbring-Hertz, 1988). A formação dessas estruturas é a resposta à presença de nematóides ou de substâncias dele derivados, podendo ainda ocorrer em consequência de condições nutricionais limitantes e/ou escassez de água (Balan e Gerber, 1972). A diferenciação da hifa pode ocorrer dentro de 24 horas, e numerosas estruturas de captura podem ser produzidas (Primer, 1964). Quanto maior a mobilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (Nansen et al., 1986, 1988).

Segundo Gray (1988) são conhecidos seis tipos de armadilhas: hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas; ramificações hifais anastomosadas, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas que formam redes simples, bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores.

Os nematóides geralmente são atraídos pelos fungos, e esta atração é aumentada quando as armadilhas estão presentes no micélio. Os mecanismos envolvidos na atração dos nematóides não são conhecidos (Nodbring-Hertz, 1988).

Nos fungos que apresentam armadilhas adesivas o nematóide é mantido aderido através de uma substância fibrilar adesiva rica em fosfatase ácida. A aderência é irreversível, pois mesmo que o nematóide consiga escapar da armadilha ele carregará aderido ao seu corpo, células da armadilha que penetram e desenvolvem no seu interior, consumindo suas estruturas. O processo de penetração está associado à presença de copos densos ricos em enzimas que atuam na fase inicial de degradação da cutícula do nematóide e desaparecem após a penetração. Estes corpos densos são encontrados apenas nas armadilhas e nunca em hifas vegetativas (Jansson e Nodbring-Hertz, 1988). Ahman et al. (2002) relatam a presença de uma protease serina extracelular, designada PII, presente nas

armadilhas do fungo *Arthrobotrys oligospora*, que apresenta atividade nematotóxica, provocando a paralisia dos nematóides quando se encontra em alta concentração.

A penetração em nematóides capturados por armadilhas de *Arthrobotrys oligospora* geralmente ocorre dentro de 2 a 4 horas após captura. O processo de penetração inicia por ação enzimática provocando hidrólise parcial ou total da cutícula do nematóide, associado à força mecânica pelo crescimento de tubos de penetração que rompem a cutícula, penetram no nematóide e desenvolvem hifas digestivas que o consomem (Veenhuis et al., 1985). Após a captura, independente da armadilha utilizada, o fungo se desenvolve no interior do nematóide consumindo seu conteúdo e lançando para o meio externo suas estruturas vegetativas e reprodutivas (Barron, 1977; Gray, 1987).

Para que ocorra o desenvolvimento de tubos de penetração é necessário o reconhecimento do nematóide pelo fungo, constatado por Veenhuis et al. (1985) ao colocar corpos estranhos em armadilhas de *A. oligospora*, observando que não havia a formação dos tubos, ao invés, as células da armadilha envolvidas na captura dos corpos estranhos entraram num processo de degradação que teve início 24 a 48 horas após captura.

Nodbring-Hertz e Mattiasson (1979) relataram a presença de estruturas semelhantes a lectina que se ligam a carboidratos presentes na superfície dos nematóides. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, as quais têm habilidade de aglutinar células e têm afinidades específicas para um ou mais carboidratos, estas proteínas estão presentes em plantas e animais, e sua verdadeira função é desconhecida (Ibrahim, 1991).

Os fungos nematófagos podem apresentar esporos bastante diversificados no tamanho, coloração, forma e resistência no ambiente. A maioria dos fungos nematófagos apresenta esporos secos, emergindo de estruturas de frutificação, denominadas conidióforos, essenciais na dispersão aérea dos conídios. Os conidióforos crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato o qual o isolado foi cultivado. Algumas espécies produzem conidióforos contendo apenas um conídio em sua extremidade, outras espécies apresentam cachos de conídios em toda a estrutura do conidióforo. Estruturas denominadas clamidósporos também podem ser produzidas. Estes são esporos de parede espessa, diferenciada a partir das hifas, aparecem em condições de estresse extremo e podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (Barron 1977).

A grande maioria dos fungos nematófagos é mitospóricos e antigamente 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. 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*. Recentemente, estágios de reprodução sexuada destes fungos foram observados para algumas espécies que estão sendo reconhecidas como pertencentes ao filo Ascomycota (Mota et al., 2003).

As espécies de fungos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *M. appendiculatum*, *M. sinense*, *Arthrobotrys conoides*, *A. cladodes*, *A. robusta* são identificadas como nematófagas (Barron, 1977), e têm sido estudadas quanto ao seu potencial como agentes controladores biológicos de helmintos gastrintestinais de animais domésticos (Araújo et al., 1993; Larsen et al., 1995; Araújo et al., 1998; Gomes, 1998; Araújo et al., 1999; Alves et al., 2003; Dimander et al., 2003). Apesar do grande número de espécies de fungos, a maioria dos estudos com fungos nematófagos têm se concentrado em espécies predadoras pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (Larsen, 2000).

O gênero *Arthrobotrys* reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos. O gênero foi descrito por Corda em 1839, originário de amostras de solo, porém nesta época, a capacidade de predação de nematóides não foi mencionada. Todos os isolados do gênero são capazes de produzir armadilhas na presença de nematóides de vida livre, como *Panagrellus redivivus* ou *Turbatrix aceti*. O gênero é classificado como nematófago facultativo (Cooke e Godfrey, 1964, Mota et al., 2003). As espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos de até três septos, com formato ovóide, proliferando-se na extremidade dos conidióforos. Há abundância na formação de conidióforos e no processo de conidiogênese, iniciado de forma simpodial (Zhang et al., 1996a). A espécie *A. robusta* possui conidióforo ereto, algumas vezes ramificado, com cerca de 300 µm de comprimento, com a extremidade do conidióforo aumentada de tamanho, carregando normalmente 6 conídios de formato ovóide, hialino, septados próximo a região mediana, medindo 18-27 µm de comprimento por 8-12 µm de largura. Não são capazes de produzir clamidósporos e produzem redes adesivas para predação de nematóides (Van Oorschot, 1985).

Para o gênero *Duddingtonia* as espécies são caracterizadas por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos (Van Oorschot, 1985). Os conídios apresentam formato variando entre elíptico e ovóide apresentando um septo mediano. *Duddingtonia flagrans* é a espécie mais estudada no controle das helmintoses gastrintestinais de animais

domésticos. Predam nematóides por meio de hifas adesivas. Produzem conídios com morfologia de 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura (Cooke e Godfrei, 1964). Produzem grande quantidade de clamidósporos em matéria seca. A maioria dos isolados mantida em laboratório foram isolados de fezes de animais e na matéria orgânica presente no solo.

O gênero *Monacrosporium* foi descrito inicialmente por Oudermans em 1885. As espécies são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Os conídios são hialinos, fusiformes, com dois a quatro septos transversais, sendo que a célula intermediária é maior que as da extremidade. A espécie *M. thaumasium* preda nematóides através de redes adesivas, produz conídios medindo entre 27-49 µm de comprimento por 15-23 µm de largura. O conidióforo é ramificado próximo a extremidade, onde cada extremidade carrega um conídio (Liu e Zhang, 1994; Zhang et al, 1996b). Normalmente é evidenciada a presença de clamidósporos em culturas de placa com meio de cultura sólido limitante (Saxena e Mittal, 1995).

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, reduzindo em grande parte as reinfestações e contribuindo para a sua profilaxia (Mota et al., 2003).

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. (2002), para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e ambiente do mesmo tempo que as formas pré-parasitárias. Por outro lado, a baixa competitividade com fungos saprófitas 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 que em fezes frescas (Juniper, 1957). Por isso, é necessária uma seleção de fungos nematófagos que possam atravessar o trato gastrintestinal dos animais, mantendo suas qualidades de crescimento e predação das fases pré-parasitárias nas fezes (Gronvold et al., 1996b).

3. OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia dos fungos predadores das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *M. appendiculatum*, *M. sinense*, *Arthrobotrys conoides*, *A. cladodes*, *A. robusta* no controle de larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. em condições de laboratório.
2. Selecionar, em testes in vitro, quais dos fungos nematófagos estudados são mais eficientes no controle das Ancilistomoses gastrintestinais de cães.
3. Determinar quais das espécies fúngicas são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de cães, desenvolver nas fezes e capturar larvas infectantes de *Ancylostoma* spp.
4. Testar a utilização de micélio fúngico para o controle de nematóides parasitos gastrintestinais de cães no ambiente.
5. Avaliar a eficácia dos fungos oportunistas *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium*) no controle de ovos de *Taxocara canis*.

CAPITULO 1

**Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.:
evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs**

Journal of Helminthology, 83(3):231–236, 2009

Abstract

The predatory capacity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. cladodes* (CG719) and *A. robusta* (I-31) on infective *Ancylostoma* sp. larvae (L₃) was evaluated. Compared with the control without fungi there was a significant reduction ($p < 0.05$) of 87.02%, 82.74%, 47.93%, 60.49%, 76.89%, 71.33% and 86.02% in the mean number of *Ancylostoma* sp. (L₃) recovered from treatments with the isolates AC001, NF34a, CGI, SF53, I-40, CG719 and I-31, respectively. Isolates AC001, I-31 and NF34a were more effective to capture L₃ during the *in vitro* assay. Isolates were then *in vivo* evaluated for the capacity to remain viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs, while still maintaining the predatory activity against L₃. Fungal isolates survived the passage and showed efficient predation 48h post collection ($p < 0.05$). After this time, only the isolate NF34a remained effective up to 96h post collection ($p < 0.05$). *M. thaumasium*, *D. flagrans* and *A. robusta* are potential biological control agents of *Ancylostoma* sp. in dogs.

Keywords: nematophagous fungi, *Ancylostoma* spp, dogs, biological control

1. Introduction

Dogs and cats worldwide play important social role as company for people, contributing to physical and emotional development of children and improving quality of life of their owners, particularly of seniors (Robertson *et al.*, 2000). These animals, despite their social benefits, are also considered a risk to human health, as they can transmit infectious agents such as parasites, bacteria, fungi and virus (Robertson & Thompson, 2002).

Ancylostoma sp., among other intestinal helminthes carried by dogs and cats, demands great attention because it's zoonotic potential (Robertson & Thompson, 2002), mainly soil contamination by faeces of infected animals. More than 1 billion people in the world are estimated to get infected by soil-transmitted helminthes (Crompton, 1999).

Nematode-antagonistic fungi can be classified into predatory, opportunistic (egg parasites and female plant-parasitic nematodes), endoparasitic and toxic metabolite-producing fungi (Mota *et al.*, 2003). Predatory fungi are the most studied nematode antagonistic organisms because of their capacity of effectively reducing the nematode population in laboratory and field conditions (Larsen, 1999; Mota *et al.*, 2003). Among predatory species, *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* and *Monacrosporium* have stood out as

potential agents in the biological control of parasitic nematodes in domestic animals (Larsen *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1998, 1999, 2000; Araújo & Ribeiro, 2003; Alves *et al.*, 2003; Dimander *et al.*, 2003). A fungal isolate is considered as a potential biological controller of parasitic nematodes if it remains viable after passing through the gastrointestinal tract of animals, colonize the fecal mass and capture hatched parasite larvae before they migrate to the soil (Araújo & Ribeiro, 2003).

The objective of the present study was to compare the *in vitro* predatory activity of the isolates of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. cladodes* (CG719) and *A. robusta* (I-31) on infective *Ancylostoma* sp. larvae parasitizing dogs. The capacity of remaining viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs while maintaining the predatory activity against infective *Ancylostoma* spp. larvae was also examined.

2. Material and methods

2.1. *In vitro* test

Brazilian isolates of *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. cladodes* (CG719) and *A. robusta* (I-31) were stored in test tubes containing 2% corn-meal-agar, in the dark, at 4°C.

Panagrellus sp. free-living nematodes were kept in Petri dishes containing medium of moistened and mashed oat flakes. Nematodes were recovered from the culture medium by soaking small oat amounts in distilled water in a Baermann apparatus and collecting them in hemolysis tubes after six hours of decantation.

Culture disks, 4mm in diameter, extracted from each isolate were transferred to 8.5-cm diameter Petri dishes containing 2% water-agar (2% WA) and stored in the dark at 25°C to induce conidia production. These plates were then added with 1ml of suspension containing 1000 *Panagrellus* sp., at every three days during 21 days, until complete growth of fungal mycelium and complete nematode predation. After this period, 5 ml of distilled water was added to each Petri dish. Conidia and fragments of fungal mycelium were removed with a paintbrush and stored at 4°C.

Infective *Ancylostoma* sp. larvae (L₃) were obtained from faeces of naturally infected dogs by vermiculite coproculture at 28°C, 80% humidity, for 15 days, and later using a Baermann funnel and water at 42-45°C with decantation time of 12 hours.

Treated groups, for each fungal species, consisting of 1.000 conidia and 1.000 L₃ and a control group with 1.000 L₃ (without fungi) were formed in order to study the fungal predatory activity on *Ancylostoma* sp. L₃ (Araújo *et al.*, 2006a).

Groups consisting of fungi and L₃ were plated on 8.5-cm diameter Petri dishes, containing 2% WA culture medium previously marked with agar perforators, forming 4-mm diameter fields on the surface, incubated at 25°C in the dark. Plates were daily examined by light optical microscope (x10 Objective lens) for 10 days. Ten fields per dish were randomly chosen and the number of non-predated L₃ was counted to obtain the mean number of L₃ per field.

On the day 10, L₃ larvae were recovered using a Baermann funnel (water at 42-45°C; 12-h decantation time) and counted to obtain the mean L₃ number recovered from the control group and mean number of non-predated L₃ from treated groups.

Data were examined by the analysis of variance (test F), Tukey's test and linear regression, at 5% probability level. The average percentage of L₃ reduction in the treated groups was calculated by the following formula:

$$\text{Reduction (\%)} = \left[\frac{\text{Mean L}_3 \text{ recovered from control group} - \text{Mean L}_3 \text{ recovered from treated group}}{\text{Mean L}_3 \text{ recovered from control group}} \right] \times 100$$

2.2. Passage Test

The effectiveness of fungal isolates *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34a) and *A. robusta* (I-31) against *Ancylostoma* sp. L₃, after having passed through the gastrointestinal tract of dogs was tested.

Fungal mycelium formation was induced by transferring 4-mm culture disks (2% WA) to 250ml Erlenmeyers flasks, containing 150ml of GPY (glucose-peptone-yeast extract) in liquid medium. Flasks were agitated at 120 rpm, in the dark, at 26°C for 10 days. After this period, mycelia were removed, filtered and weighed in an analytical scale.

Twenty-four adult dogs, no specific breed, average weight 14 Kg (ranging from 11 to 17 Kg) used in this experiment were treated with anthelmintic (pyrantel pamoate, febantel and praziquantel) 15 days before receiving fungal mycelia.

Animals were randomly separated into groups of 6 dogs; three groups were treated with fungi and a non-treated control group. They received water and commercial dog food (18% crude protein, 6% ethereal extract, 6.5% crude fiber and 12% moisture) *ad libitum*.

The treated groups received an oral dose of 1g/kg body weight of fungal mycelium, mixed with the same proportion of commercial canned dog food (8% crude protein, 4% ethereal extract, 1.5% crude fiber and 80% moisture). The control group received orally 1g/kg body weight of commercial canned dog food without fungal mycelium.

Faecal samples were collected at 8, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after the treatment with the fungal mycelium and the control without fungi. Samples from each group were homogenized, then 2g were placed in 5-cm Petri dishes containing 2% AA and incubated at 25°C in the dark with 1.000 *Ancylostoma* sp. L₃. Five replications of each treatment and the control group were used for each established time. Plates were examined daily for conidia and conidiophores typical of the analyzed isolates, according to classification proposed by Van Oorschot (1985) and Liu and Zhang (1994). On the fifteenth day, non-predated L₃ larvae were recovered from the Petri dishes using Baerman technique and the average non-predated L₃ per dish was recorded.

Data were examined by analysis of variance and regression analysis. Means were compared using the Tukey's test, 5% probability level.

3. Results and discussion

The tested isolates *Duddingtonia flagrans* (isolate AC001), *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a), *M. appendiculatum* (isolate CGI), *M. sinense* (isolate SF53), *Arthrobotrys conoides* (isolate I-40), *A. cladodes* (isolate CG719) and *A. robusta* (isolate I-31) showed *in vitro* predatory capacity on *Ancylostoma* sp. L₃. Trap formation and L₃ predation by the fungal isolates were confirmed in the first assessment, after 24 hours of interaction. This result agrees with the findings of Araújo *et al.* (2006a) with *Cooperia* sp. and *Oesophagostomum* sp. in cattle, as well as Maciel *et al.* (2006) with *Ancylostoma* sp. in dogs. Traps are formed in response to the presence of nematodes and may occur in consequence of limiting nutritional conditions and/or water shortage (Scholler & Rubner, 1994; Gronvold *et al.*, 1996). Nematode mobility acts as a stimulus for the induction of trap formation (Nansen *et al.*, 1988). The presence of *Ancylostoma* sp. L₃ 2% water-agar plates was essential for trap formation by fungal isolates, since the culture medium is nutritionally poor. Nematophagous fungi were not detected in control plates.

Means of non-predated L₃ per field (4mm diameter) of control plates were higher than means of non-predated L₃ of plates treated with fungi in all experimental periods ($p < 0.05$). There was significant difference ($p < 0.05$) among the treatments for means of the

3rd, 4th, 9th and tenth days. No differences were found ($p>0.05$) among means of non-predated L₃ during the other days (Table 1).

Table 1 Daily mean of non-predated infective *Ancylostoma* sp. (L₃) larvae per 4-mm diameter field, on 2% water-agar medium, during 10 days, for treatments with fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. clododes* (CG719), *A. robusta* (I-31) and control group (without fungi).

Time (Days)	Treatments (means of non-predated L ₃)							
	I-31	AC001	CGI	SF53	I-40	NF34a	CG719	CONTROL
1	1.93 _A	1.75 _A	1.65 _A	1.87 _A	1.73 _A	1.52 _A	1.72 _A	10.18 _B
2	1.00 _A	0.40 _A	0.33 _A	0.95 _A	0.58 _A	0.98 _A	0.98 _A	4.47 _B
3	0.43 _A	0.12 _A	0.28 _{A,B}	0.78 _{B,C}	0.23 _A	0.18 _C	0.83 _{A,B,C}	3.42 _D
4	0.82 _{A,B}	0.80 _{A,B}	0.32 _A	0.45 _{A,B}	0.87 _B	0.43 _{A,B}	0.67 _{A,B}	3.45 _C
5	0.68 _A	0.88 _A	0.48 _A	0.70 _A	0.85 _A	0.85 _A	0.78 _A	5.12 _B
6	0.57 _A	0.75 _A	0.55 _A	0.53 _A	0.67 _A	0.53 _A	0.48 _A	2.53 _B
7	0.52 _A	0.47 _A	0.35 _A	0.43 _A	0.58 _A	0.55 _A	0.40 _A	3.03 _B
8	0.53 _A	0.42 _A	0.27 _A	0.47 _A	0.23 _A	0.43 _A	0.38 _A	2.27 _B
9	0.32 _{A,B}	0.23 _A	0.05 _B	0.22 _{A,B}	0.12 _{A,B}	0.47 _{A,B}	0.33 _{A,B}	1.95 _C
10	0.10 _B	0.60 _{A,B}	0.10 _A	0.13 _A	0.28 _{A,B}	0.35 _{A,B}	0.37 _A	1.28 _C

Means followed by at least one common capital letter in the row are not significantly different by the Tukey's test at a 5% probability level.

Predation was confirmed by the mean numbers of L₃ recovered using the Baerman method at the end of the experiment (Fig.1). After 10 days, the mean numbers of L₃ recovered from control plates were larger than the mean numbers of L₃ recovered from groups treated with fungal isolates ($p<0.05$). No difference was found among means of L₃ recovered from treated groups for the isolates AC001, NF43a, I-40, CG719 and I-31 ($p<0.05$). Comparison of treated groups with the control showed that the isolates AC001, I-31 and NF34a had the lowest L₃ recovery, with L₃ reduction of 87.02%, 86.02% and 82.74% respectively. These isolates were followed by I-40 with 76.89% of reduction, CG719 with 71.33%, SF53 with 60.49%, and finally CGI with 47.93% of reduction.

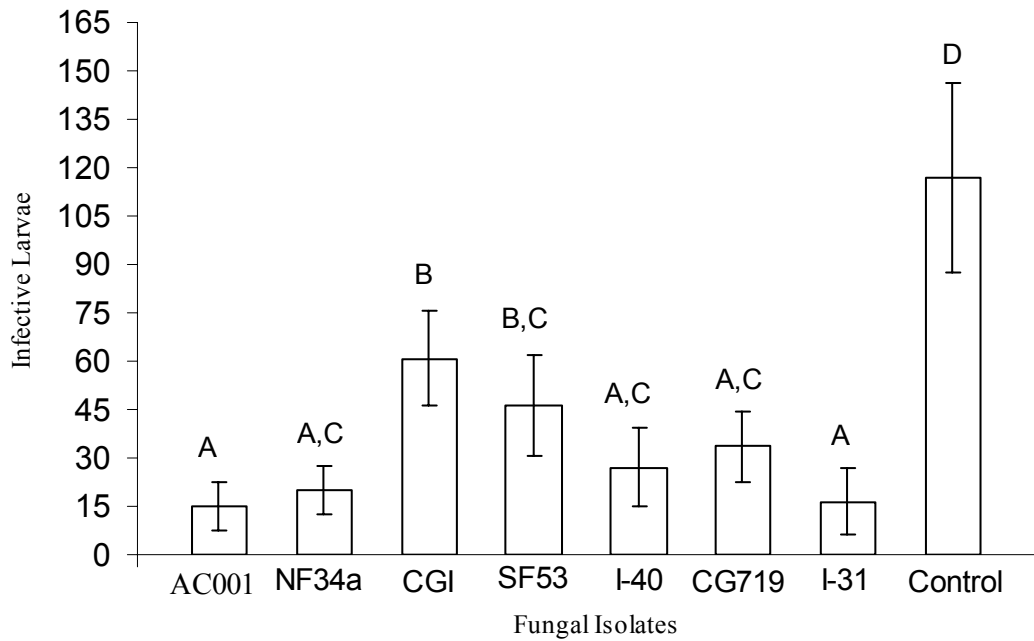


Fig.1 Means and standard deviation (bars) of infective non-predated *Ancylostoma* sp. larvae recovered from 2% water-agar plates by the Baermann method on the tenth day of treatment with the following fungal isolates: *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *M. appendiculatum* (CGI), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys conoides* (I-40), *A. clododes* (CG719), *A. robusta* (I-31) and a control group (without fungi). Means followed by at least one common capital letter in the row are not significantly different by the Tukey's test at a 5% probability level.

The predatory fungal species used in this study have been reported as effective against parasitic nematodes in bovines (Araújo *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2003), small ruminants (Mota *et al.*, 2000; Chandrawathani *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2006b) and equines (Castro *et al.*, 2003). Maciel *et al.* (2006) evaluated *in vitro* tests the predatory capacity of *Arthrobotrys robusta* (isolate I-31), *Duddingtonia flagrans* (isolate CG768) and *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a) on *Ancylostoma* sp. L₃. The authors found the highest predatory capacity for the isolate I-31, followed by CG768 and NF34a, with reductions of 97.75%, 89.89% and 88.76% respectively. In this work, the fungal species *D. flagrans* (isolate AC001) presented the largest percentage of reduction, followed by *A. robusta* (isolate I-31) and *M. thaumasium* (isolate NF34a).

Linear regression coefficients calculated by using the means of L₃ per 4-mm diameter field of treated and control groups were -0.65 (control), -0.068 [*Duddingtonia flagrans* (AC001)], -0.078 [*Monacrosporium thaumasium* (NF34a)], -0.096 [*M.*

appendiculatum (CGI)], -0.137 [*M. sinense* (SF53)], -0.105 [*Arthrobotrys conoides* (I-40)], -0,122 [*A. cladodes* (CG719)] and -0.132 [*A. robusta* (I-31)]. The negative values indicate a descending tendency of regression curves for the treatments, as there was a decrease in the means of non-predated L₃ per 4-mm diameter field during the 10 days. This decrease was mainly caused by the capture of L₃ by fungal traps. The decrease in the means of L₃ per 4-mm diameter field in the control group during the 10 days of observation was caused by the larval migration to the periphery of the plate, with higher humidity level. This migration was also reported by Araújo *et al.* (2006a) *in vitro* tests carried out in Petri dishes.

Although the predatory capacity against L₃ of isolates AC001, I-31 and NF34a were not significantly different ($p < 0.05$) from I-40 and CG719, *in vitro* results showed they had higher percentages of reduction and were used in the test of viability after passing through the gastrointestinal tract of dogs.

Mean number of *Ancylostoma* sp. L₃ recovered from plates incubated with two grams of faeces from animals of the treated groups (with the isolates AC001, I-31 and NF34a), and from animals of the control group (without fungi) are shown in Table 2. The isolates AC001, I-31 and NF34a remained viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs and were able to predate on *Ancylostoma* sp. L₃.

Table 2 Means for the number of *Ancylostoma* sp. infective larvae recovered from plates prepared with dog feces and sampled at 8, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hours after the treatment with 1g mycelium/ kg of live weight, with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Arthrobotrys robusta* (I-31) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), and control (without fungi).

Treatments	Time (hours)					
	8 h.	12 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
AC001	15.50 _{A,a,b}	11.67 _{A,a,b}	12.33 _{A,a,b}	10.17 _{A,b}	20.33 _{A,B,a,c}	27.00 _{A,c}
I-31	12.83 _{A,a,b}	13.17 _{A,a,b}	9.67 _{A,b}	10.50 _{A,b}	17.50 _{A,B,a,b}	19.83 _{A,B,a}
NF34a	14.83 _{A,a}	15.67 _{A,a}	10.00 _{A,a}	9.83 _{A,a}	15.33 _{A,a}	11.67 _{B,a}
Control	32.67 _{B,a}	23.33 _{B,a}	22.67 _{B,a}	20.67 _{B,a}	27.83 _{B,a}	29.33 _{A,a}

Means followed by at least one common capital letter, in the columns, are not significantly different by the Tukey's test at a 5% probability level. Means followed by at least one common small letter, in the rows, are not significantly different by the Tukey's test at a 5% probability level.

Conidia were identified only on the day 14 in plates with faeces collected 12 hours after fungal administration, for all tested isolates. It was not possible to identify conidia on the other days and collection times. Only mycelia were observed. Presence of nematophagous fungi was not detected in the control group.

Mean number of L₃ recovered from the control group was larger than the mean number of L₃ recovered from the treated groups ($p < 0.05$) until 48 hours, except at 72 and 96 hours, in which only the isolate NF34a showed mean number of L₃ significantly smaller than the control group ($p < 0.05$). This suggests that this fungal isolate is eliminated in the faeces in a period of at least 96 hours after ingestion of mycelia, whereas AC001 and I-31 were eliminated up to 48 hours. It has been shown that the isolate NF34a remained viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs up to 96 hours.

Isolates AC001 and NF34a presented the lowest mean numbers of recovered L₃ 48 h after fungal administration, indicating a higher predatory activity. The isolate I-31 showed higher predatory activity 24 hours after the ingestion of fungal mycelia. A higher larval predation within the same treatment is directly related with the period of higher fungal elimination through faeces. This could be influenced by the type and amount of food supplied during the experiment, as well as the tested fungal doses (Araújo & Ribeiro, 2003). In this work, dogs received the same type and amount of food and fungal mycelium was administrated according to body weight.

D. flagrans (AC001), *A. robusta* (I-31) and *M. thaumasium* (NF34a) showed predatory capacity on dog *Ancylostoma* sp. (L₃) after passing through the gastrointestinal tract, remaining viable. They were also effective against L₃ ($p < 0.05$) after the first 48 h of collection. After this period, only NF34a remained effective in samples collected 72 and 96 hours after fungal administration ($p < 0.05$). At the end of the experiment (96 hours), the reduction in the mean number of recovered L₃ in the group treated with the isolate NF34a was 60.21%, whereas the groups treated with AC001 and I-31 had reduction percentages of 7.94% and 32.39%, respectively.

Regression curves show (Fig. 2) that the isolate *M. thaumasium* (NF34a) was the only with negative linear correlation coefficient ($r = -0.017$), whereas *D. flagrans* (AC001) and *A. robusta* (I-31) had positive values ($r = 0.145$ and $r = 0.087$, respectively). Negative coefficient indicates the existence of inverse correlation between variables, showing that there was reduction of the number of recovered larvae (no predadas) over time. Positive coefficient indicates that there was increase of the number of recovered larvae over time, taking the decrease of the effectiveness.

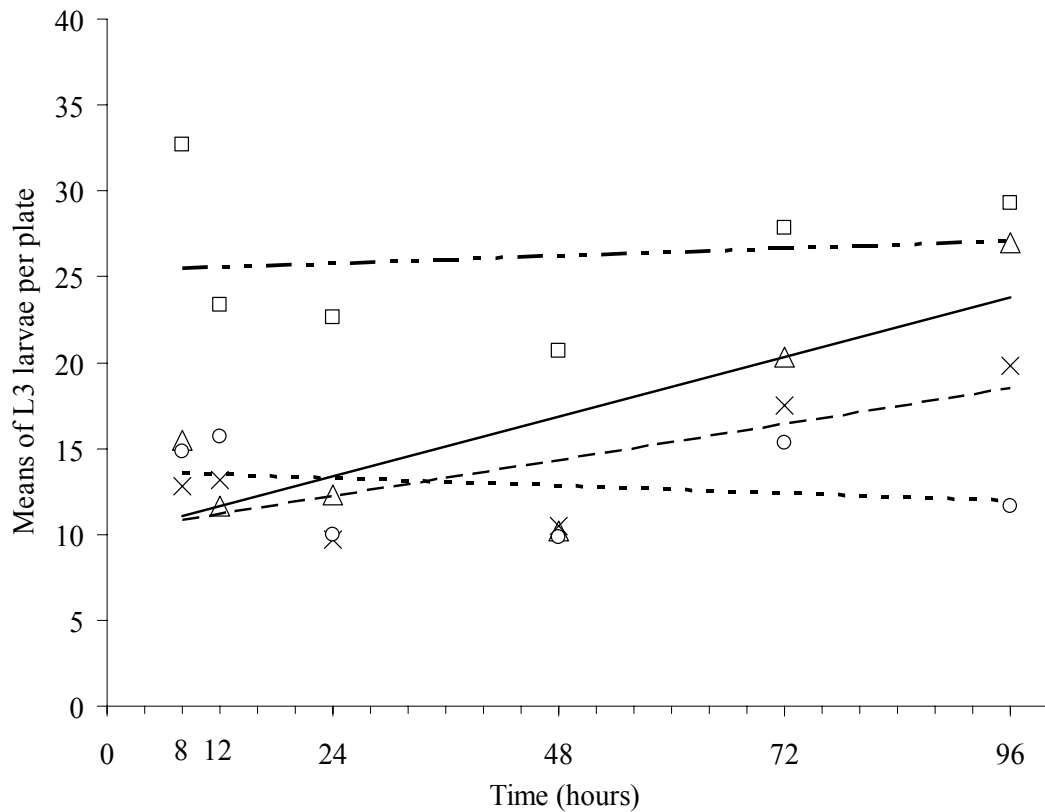


Fig.2 Linear regression curves of *Ancylostoma* sp. infective larvae (L₃), recovered from 2% water-agar plates (5 cm in diameter) incubated at 25°C for 15 days with the isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001, △, —, $y = 9.8941+0.1448*h$, $R^2 = 0.6327$), *Arthrobotrys robusta* (I-31, ×, — —, $y = 10.1407+0.0871*h$, $R^2 = 0.5960$), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a, o, - - - , $y = 13.6431-0.0174*h$, $R^2 = 0.0515$) and control (without fungi, □, — - -, $y = 25.280+0.0185*h$, $R^2 = 0.0203$) as a function of time (8 to 96 hours).

This is the first report on the viability of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of dogs while still remaining effective against *Ancylostoma* sp. L₃. Since the isolates remained viable and effective in the control of *Ancylostoma* sp. after passing through the gastrointestinal tract of dogs, their administration to animals contaminated by *Ancylostoma* sp. can decrease environmental contamination, acting directly on larvae present in the soil.

4. Conclusion

All tested fungal isolates showed *in vitro* action against *Ancylostoma* sp. L₃, having a larger predatory activity of the nematophagous fungi *D. flagrans* (isolated AC001), *A. robusta* (isolated I-31) and *M. thaumasium* (isolated NF34a), staying viable after passing through the gastrointestinal tract of dogs. These fungal species are therefore promising for future use in the biological control of *Ancylostoma* sp. in dogs.

CAPITULO 2

Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil

Veterinary Parasitology, 165(1-2):179–183, 2009

Abstract

Parasitic nematodes *Ancylostoma caninum* and *A. braziliense* affect dogs and cats and have great medical and veterinary importance for their high prevalence, zoonotic potential, cosmopolitan characteristic and soil contamination by eggs and larvae. In order to evaluate the efficiency of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a) in the biological control of dog hookworm, twelve adult animals, average weight between 7 and 19Kg, were separated into groups and kept in two different kennels: control group (without fungus) and a group treated with 0.5g of fungal mycelium per kilogram of body weight. The animals were treated and feces samples were collected for egg count (eggs per gram of feces - EPG) and coprocultures during six months, twice a week. Every 15 days soil samples were collected from each group and examined for infective larvae (L₃) in the period between March and September 2008. From April onwards, EPG and coproculture recordings in the treated group were lower than the control group ($p < 0.05$). Linear regression coefficients for the control group were -30.79 and -160.79 for coproculture and EPG means, respectively. The linear regression coefficients for the treated group were -5.64 and -67.64 for EPG and coproculture means, respectively. Larvae were detected in the soil throughout the experimental period. From June to the end of the experiment (September), means of L₃ recovered from the kennel soil of the control group were higher than the means of the kennel soil of the treated group ($p > 0.05$). The regression coefficient was higher for the treated group (-5.36) than the control group (-1.14), confirming the action of *M. thaumasium* against larvae in the soil. *M. thaumasium* can be therefore considered an alternative environmental control of *Ancylostoma* spp. in dogs.

Keywords: Nematophagous Fungi, Biological Control, Environmental Control, *Monacrosporium thaumasium*, *Ancylostoma* sp., Nematodes.

1. Introduction

Intestinal helminths, such as *Ancylostoma caninum* and *A. braziliense*, parasitizing dogs and cats have demanded considerable attention for their zoonotic potential (Robertson and Thompson, 2002), which is a direct consequence of soil contamination with feces from parasitized animals. Parasite development takes place at temperatures between 23°C and 30° C. Infected animals may develop anemia, diarrhea, hemorrhagic enteritis, vomiting, depression and weight loss, and in some cases leading to death (Burrows et al. 1995; Bowman, 2003).

The development and implementation of alternative prevention and control methods of geohelminths is crucial to reduce environmental contamination by infective larvae and eggs (Labarthe et al., 2004).

Predatory fungi are the most studied nematode antagonistic organisms for their effective capacity to reduce nematode populations in laboratory and field conditions (Larsen, 1999). These fungi produce traps that capture nematodes, following hyphal penetration of the cuticle, hyphal growth and digestion of internal contents (Araújo et al., 2007).

Among these microorganisms, the fungus *Monacrosporium thaumasium* stand out for its proven potential as control agent of nematode parasites of domestic animals (Araújo et al., 1999, Araújo et al., 2007).

Carvalho et al. (2009) confirmed the effectiveness of *Monacrosporium thaumasium*, *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in the biological control of hookworms after passage through the gastrointestinal tract of dogs. Among them, *M. thaumasium* showed the most promising results.

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (isolated NF34a) in the control of *Ancylostoma* spp. infective larvae (L₃) in dogs.

2. Materials and Methods

The experiment was carried out at the Animal Protection Society of Viçosa (SOVIPA), in the city of Viçosa, latitude 20°45'14" South, longitude 42°52'55" West, Minas Gerais, Brazil, from March 1st to September 15th 2008.

This study used the nematode predatory fungus *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a) provided by the Parasitology Laboratory at the Federal University of Viçosa, Brazil. Fungal cultures were kept in test tubes containing 2% corn-meal-agar, at 4°C, in the dark.

Culture disks, 4mm diameter, with grown fungus in 2% water-agar (2%WA) for 7 days at 25°C, in the dark, were transferred to Erlenmeyer flasks (250ml) with 150ml of liquid GPY medium (glucose, sodium peptone and yeast extract), under agitation of 120 rpm at 26°C, in the dark, for 10 days, to induce mycelium formation. After this period, mycelia were removed, filtered and weighed in an analytical balance.

Twelve adult dogs (over 1 year old), mixed breed, six males and six females, with 13Kg average weight (ranging from 7 to 19 kg) were divided into two groups and kept in

separate kennels, each with 128m² of area: a control group (without fungi) and a group treated with *M. thaumasium* (isolate NF34a). The animals received water and commercial dog food (18% crude protein, 6% ethereal stratum, 6.5% fiber matter and 12% moisture) *ad libidum*.

Each kennel had a shelter and a grassed area (*Axonopus afinis*) of approximately 105m². These kennels presented a history of intensive dog rearing for 8 years and were naturally infected by *Ancylostoma* spp. eggs and larvae.

Fecal flotation in saturated NaCl solution (Willis' method) was performed to confirm helminth infection by *Ancylostoma* spp. The dogs were treated with Pyrantel Pamoate at 14.4 mg/Kg live weight, Praziquantel at 5mg/kg live weight and febantel at 15mg/kg live weight (Drontal Plus ® Bayer, São Paulo-SP, Brazil). Following the anthelmintic treatment, a new fecal flotation (Willis' method) was carried out to confirm deworming effectiveness.

Fifteen days after the anthelmintic treatment, each animal in the treated group received 0.5 g of fungal mycelium per Kg of body weight, mixed with commercial moist dog food containing 8% crude protein, 4% ethereal stratum, 1.5% fiber matter and 80% moisture, in the same proportion. Treatments were administered twice a week for six months. Animals from the control group received only 0.5 g of moist food per Kg of body weight in the same days as the treated group.

Feces samples were collected from all dogs in each kennel twice a week. The samples were then mixed, composing a 100g fecal sample for each group. Egg count (EPG) was performed according to the fecal flotation method in saturated NaCl solution by Gordon and Whitlock (1939). Coprocultures were performed together with EPG using 20g of a mixture of feces and vermiculite, moistened and kept in an oven at 26°C for 15 days to obtain *Ancylostoma* spp. L₃.

Feces samples (2g) were placed in 10 Petri dishes containing 2% WA added with 1000 *Panagrellus* sp. (free living nematode) and placed in an oven at 25°C for ten days to confirm the passage of the fungus through the gastrointestinal tract of dogs and growth in feces.

Soil samples were collected in different points from each kennel every 15 days. The samples were mixed, and 60g of soil from each kennel was used to detect *Ancylostoma* spp. L₃. Larvae were recovered using a Baermann funnel (water initially at 42 to 45°C and 12-h decantation).

Dogs were weighed each month to adjust administration of fungal mycelium and moist food per animal and compare weight gain between the animals groups.

Meteorological data (rainfall and average temperature) for the period between March 1st and September 15th, 2008 were obtained from a meteorological station.

For statistical analysis, data from EPG, coprocultures and the number of larvae recovered from the soil were transformed into $\log x + 1$ and examined by analysis of variance and the Tukey's test at 1 and 5% probability levels. Data from EPG, coprocultures and the number of larvae recovered from the soil were analyzed by linear regression analysis to determine data correlation during the experiment (Ayres et al., 2003).

3. Results

Analysis of plates containing 2%WA with 2g of feces showed that *M. thaumasium* was able to survive the passage through the gastrointestinal tract of dogs, demonstrating the fungal growth on plates and ability to predate *Panagrellus* sp. Presence of nematophagous fungi was not detected during the experiment in the feces of the control group.

Average monthly temperatures and rainfall are shown in Figure 1. The average temperature in most months was around 20°C. July had the lowest average temperature (15.3°C) and lower rainfall (8.3 mm³).

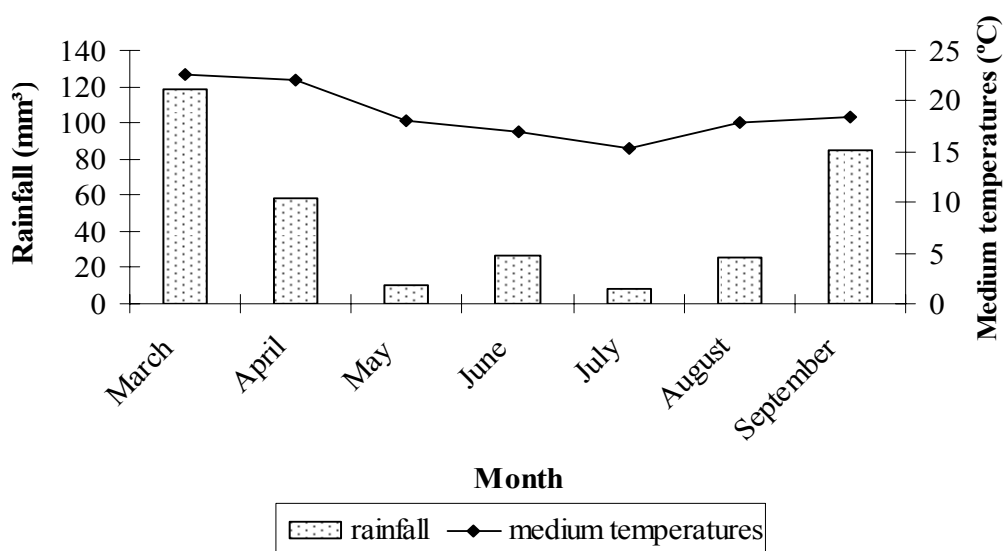


Fig. 1. Monthly averages of rainfall (mm³) and medium temperatures (°C) between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Mean EPG of the control group was higher than the mean of the treated group in all experimental months ($p < 0.05$), except in March ($p > 0.05$), when *Ancylostoma* spp. eggs were only found in the last day of collection, 30 days after deforming (Table 1).

Table 1 – Monthly means of Eggs per gram of faeces (EPG) counts and Coprocultures of *Ancylostoma* sp. and standard deviation (\pm) of the group of animals treated with *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a), with 0.5g of mycelium per Kg of live weight and control group without fungi between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Months	EPG		Coprocultures	
	Treated Group	Control Group	Treated Group	Control Group
March	0 ^a \pm 0.00	75 ^a \pm 150.00	51 ^a \pm 102.00	258 ^a \pm 516.50
April	350 ^a \pm 311.68	1458 ^b \pm 700.00	1582 ^a \pm 641.20	4923 ^b \pm 7783.25
May	467 ^a \pm 217.94	1422 ^b \pm 677.82	2369 ^a \pm 819.04	3401 ^b \pm 763.98
June	175 ^a \pm 46.29	750 ^b \pm 316.23	511 ^a \pm 439.64	1559 ^b \pm 945.49
July	183 ^a \pm 116.19	800 ^b \pm 460.43	756 ^a \pm 253.27	1511 ^b \pm 654.21
August	188 ^a \pm 64.09	588 ^b \pm 247.49	363 ^a \pm 95.25	749 ^b \pm 312.19
September	150 ^a \pm 57.47	575 ^b \pm 250.00	719 ^a \pm 177.58	2170 ^b \pm 807.66

Means of EPG followed by the same letter in the row are not significantly different at 5% probability level by the Tukey's Test. Means of Coprocultures followed by the same letter in the row are not significantly different at 5% probability level by the Tukey's Test.

The treated group showed decreased EPG numbers in months between June and September, a period of low rainfall and lower temperatures. The control group also had decreased EPG from June onwards, with lower values in August and September, subsequent to a period of low rainfall and lower temperatures.

Means for *Ancylostoma* spp. L₃ recovered from the coprocultures in the control group was higher than the means of the treated group for each experimental month ($p < 0.05$), although no statistical difference was found for March ($p > 0.05$) (Table 1).

Coprocultures showed similar behavior to EPG, showing lower values in both treated and control groups in August, following a period of low rainfall and lower temperatures.

Larvae were detected in the soil during all the experimental period, demonstrating that the climatic conditions allowed the survival of free-living stage organisms. No difference was found for means of *Ancylostoma* spp. L₃ recovered from kennel soil between the treated and control groups ($p > 0.05$), in March, April and May. From June to the end of the experiment (September), means of L₃ recovered from soil of the control kennel were higher than the means found for the treatment kennel ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 2– Monthly means and standard (\pm) deviation of *Ancylostoma* sp. infective larvae recovered from kennel soil for animals treated with *Monacrosporium thaumasium* (isolate NF34a), with 0.5g of mycelium per Kg of live weight and kennel soil of control group without fungi, between March and September 2008, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Months	Treated Group	Control Group
March	51 ^a \pm 8.19	55 ^a \pm 10.00
April	45 ^a \pm 7.20	54 ^a \pm 12.00
May	48 ^a \pm 8.41	55 ^a \pm 12.19
June	17 ^a \pm 7.74	41 ^b \pm 13.39
July	16 ^a \pm 6.21	36 ^b \pm 11.33
August	16 ^a \pm 9.40	46 ^b \pm 14.50
September	31 ^a \pm 12.52	56 ^b \pm 8.41

Means followed by the same letter in the row are not significantly different at 5% probability level by the Tukey's Test.

Linear regression coefficients calculated by EPG means were -30.79 and -5.64 for the control and treated groups, respectively. The regression coefficients for the coprocultures were -160.79 for the control and -67.64 for the treated group. Unlike the EPG and coprocultures, the linear regression coefficient, calculated using means of *Ancylostoma* spp. L₃ recovered from the soil was lower in the control group (-1.14) than in

the treated group (-5.36), confirming the action of the *M. thaumasium* against larvae in the soil.

4. Discussion

Nematophagous fungi, especially the genus *Monacrosporium* have predatory capacity against infective larvae (L3) of gastrointestinal nematode parasites of domestic animals (Araújo et al. 1999). However, there are few studies carried out with this fungus in dogs.

Carvalho et al. (2009) demonstrated that this fungus survived the passage through the gastrointestinal tract of dogs, maintaining its predatory activity. The results reported by these authors are in agreement with the present work. Araújo et al. (2007), working with *M. thaumasium* in goats in the semi-arid region of Brazil, recorded reduction in the number of eggs per gram of feces and lower parasite load in animals treated with this fungus compared with the control group.

In recent work, Braga et al. (2009) reported the action of nematophagous fungi against the first stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*, among them *M. thaumasium*. Braga et al. (2007) showed that *M. thaumasium* is also able to interact with eggs of gastrointestinal nematodes, allowing its use in contaminated environments. These findings are in agreement with results obtained in the present work, confirming that the fungus acts on the infective forms in the fecal environment, with consequent decrease in EPG.

In the case of adult dogs, above one year old, changes in animal weight of the control and treatment groups were non-significant ($p > 0.05$) during the experiment and were used only to readjust amounts of fungal mycelia and moist food supplied to each animal.

Negative values found for linear regression coefficients based on means of EPG and L₃ recovered from coprocultures indicate a downward shift of the regression curves for both groups, with reduction of EPG counts and means of L₃ from coprocultures throughout the experiment, because of climatic changes (Fig.1). The higher animal re-infection in the control group produced higher coefficients when compared to animals of the treated group (Table 1).

The highest EPG and *Ancylostoma* spp. L₃ (coprocultures) means were obtained during the months of April-May.

Araújo and Lima (2005) discussed that rain favors the development of free-living stage parasites, due to increased moisture and fecal dissolution, helping larvae migration

from the fecal mass into the soil. Lima et al. (1985), however, reported that in dry seasons, the moisture of fecal pats allows the development of free living stages and the low rainfall is enough to migration of infecting larvae of gastrointestinal parasitic nematodes. Similar results were obtained in this work.

Since nematophagous fungi act in the environment (Araújo et al., 2007), the mean numbers of larvae recovered from the soil are required to confirm the efficiency of fungal treatment, as both animal groups were exposed to the same climatic conditions.

Linear regression coefficients were calculated using the means of *Ancylostoma* spp. L₃ recovered from soil of treated and control kennels. The results were negative, but absolute values for the kennel of the control group (-1.14) were lower than for the treated group (-5.36), which indicates that *M. thaumasium* acted against larvae in the soil, reducing environmental contamination.

Fungal growth rate, according to Morgan et al. (1997), and the predatory capacity of the nematophagous fungi increase at higher temperatures, especially at temperatures ranging from 25 to 28°C. Trap formation is slower or even inhibited at low temperatures (<10°C) (Den Belder and Jansen, 1994, Morgan et al., 1997). For *M. thaumasium*, Castro et al. (2003) found no variation in the predatory capacity against cyathostominae larvae in temperatures ranging from 25 to 30°C. In this study, fewer larvae were recovered in the months of lower temperatures and rainfall (June, July and August), reducing the number of L₃ in the soil of the control kennel. However, L₃ mean in the soil of the treated kennel was significantly lower in these months with reduction in animal re-infection and consequent reduction in EPG and recovered larvae number in coprocultures.

This is the first work reporting proven viability of using nematophagous fungi in environmental control of nematodes in dogs. The use of anthelmintic in dogs and cats has been the usual method to prevent environmental contamination by *Ancylostoma* spp. eggs and larvae. Nematophagous fungi could, however, be used jointly in situations where the environment is already contaminated, reducing animal re-infection, avoiding clinical parasitism and allowing immunity development.

5. Conclusion

The use of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) was effective in the control of *Ancylostoma* spp. L₃ in the soil, reducing environmental contamination and the re-infection of dogs. This fungus offers a promising alternative for future use in the biological control of *Ancylostoma* spp. in dogs.

CAPITULO 3

Ovicidal Activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs

Veterinary Parasitology, 169(1-2):123-127, 2010

Abstract

An assessment was made of the ovicidal activity of egg-parasitizing fungi *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs *in vitro*. The fungal isolates were inoculated onto Petri dishes with 2% water-agar (2% WA) and stored at 25°C for 10 days in an incubator, in the dark. The control group was comprised of Petri dishes without fungi, containing the 2%WA medium only. Later, 1,000 embryonated eggs were placed on the surface of the plates with fungal isolates and also on the control plates, and were then incubated at 25°C for 7, 14 and 21 days. At these intervals, the eggs were retrieved and underwent percentage assessment according to the following parameters: no changes; type 1 effect, physiological and biochemical effect without morphological damage to eggshell, with visualization of hyphae adhered to eggshell; type 2 effect, lytic effect with morphological changes in embryo and eggshell, without hyphal penetration through the eggshell; type 3 effect, lytic effect with morphological changes in embryo and eggshell, with hyphal penetration and internal egg colonization. All the fungal isolates showed ovicidal activity (type 3 effect) on *T. canis* eggs, with 13.8%, 20.5% and 20.3% of ovicidal activity using *P. chlamydosporia* isolate VC1 after 7, 14 and 21 days, whereas isolate VC4 showed 15.2%, 19.0% and 21.7% of ovicidal activity at the same time intervals. *P. lilacinus* showed ovicidal activity of 12.3%, 18.8% and 20.0% after 7, 14 and 21 days. *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* were effective *in vitro* on *T. canis* eggs and can be considered a potential candidate to biological controller of those nematodes.

Keywords: Nematophagous fungi, Biological control, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, *Toxocara canis*.

1. Introduction

All over the world, dogs play an important role in society: they keep people company, enhance children's physical, social and emotional development, and foster better quality of life to their owners. In spite of their benefits, however, dogs pose considerable threat to people's health because they can transmit infectious agents such as parasites, bacteria, fungi and viruses (Robertson and Thompson, 2002).

Toxocara sp. has received a great deal of attention in face of its zoonotic potential (Robertson and Thompson, 2002), which is a direct consequence of soil contamination with feces of carrier animals. It is estimated that over 1 billion people worldwide are

infected with parasitic agents through the soil, which suggests that environmental contamination is a relevant indicator of the risk people run of contracting these infections (Crompton, 1999). In addition to soil contamination, other possible sources of human infection with *Toxocara* sp. include greater contact with dogs (Wolfe and Wright, 2003) and the ingestion of contaminated meat (Taira et al., 2004). *Toxocara* sp. eggs require an incubation period ranging from two to six weeks before becoming infective. Dogs acquire *T. canis* by ingesting eggs that contain L₂ or by preying upon rodents, reptiles and birds which may be infected and act as paratenic hosts. Transplacental and lactogenic migration also account for infection (Gillespie, 1988). *T. canis* eggs are extremely resistant to the effects of chemicals and changes in temperature, and can survive outside of a host for approximately 6 years (Ayçiçek et al., 2001). It is hence essential to implement and execute methods to prevent and control parasites in order to reduce contamination of the environment by infective eggs (Labarthe et al., 2004).

Several organisms such as viruses, bacteria, fungi and protozoa are considered to be helminth parasites of household animals. Among these organisms, egg-parasitizing fungi are saprophyte and can thus survive regardless of the presence of eggs in the soil. These fungi mechanically penetrate helminth eggs through vegetative hyphae, with or without an association with the release of exoenzymes (Nordbring-Hertz, 1988). Few studies were conducted on the use of these fungi to control helminth eggs that infect animals, but the ovicidal activity of *P. lilacinus* has been reported on *T. canis* eggs (Araújo et al., 1995; Basualdo et al., 2000), on *Taenia hydatigena* oncospheres (Ciarmela et al., 2005) and on *Taenia saginata* eggs (Braga et al., 2008a). *P. chlamydosporia* showed good *in vitro* results on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Braga et al., 2007), *Ascaris suum* (Araújo et al., 2008), *Fasciola hepatica* (Braga et al., 2008b) and *T. saginata* (Araujo et al., 2009).

The present work evaluated the ovicidal effect of *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* on embryonated *T. canis* eggs.

2. Materials and method

2.1. Organisms

Egg-parasitizing fungi *P. chlamydosporia* isolates VC1 and VC4, and *P. lilacinus* were used in this study. They were collected in Brazilian soil by the Parasitology Laboratory of the Federal University of Viçosa (in the state of Minas Gerais), and kept in test tubes containing 2% corn-meal-agar (2% CMA) at 4°C, in the dark. *T. canis* eggs were

obtained by dissecting the uterus of *T. canis* adult female worms, which had been expelled after dog deworming with pyrantel pamoate (Vermex Suspensão ®, produced by Brazilian company Indubrás S.A.).

The eggs were washed 10 times in distilled water and centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes each time. The supernatant was discarded at the end of each centrifugation cycle. The eggs were then incubated at 25°C for 14 days with a solution containing 0.05% formalin, 0.005% streptomycin sulphate and 0.01% chloramphenicol as described by Araújo et al. (1995). After this period, the washing process was repeated in distilled water as described above and the eggs underwent morphological analysis with a light microscope (10x).

2.2. *In vitro* test

Culture plates (4mm diameter) were retrieved from fungal isolates kept in test tubes containing 2% CMA, plated onto Petri dishes (8.5 cm diameter) containing 20ml of 2% potato dextrose agar, and stored in the dark at 25°C for 10 days. After fungal growth, new culture plates (4mm diameter) of each fungal isolate were placed onto Petri dishes (8.5 cm diameter) containing 20ml of 2% water-agar (2% WA) and stored in the dark at 25°C for 10 days. The control group was comprised of Petri dishes without fungi, containing only the 2% WA medium. After fungal growth, 1,000 embryonated eggs were placed on every plate of the fungal isolates and on the control plates, and then incubated at 25°C for 7, 14 and 21 days. There was a total of 6 plates per group in each period. Following these periods, 100 eggs were retrieved from each plate containing the fungal isolates and also from the plates of the control group without fungi, as described in Araújo et al (1995). The eggs were then placed on the surface of slides containing a drop of Aman-blue and examined using an objective lens at 40x magnification, according to the parameters defined by Lysek (1976): without alterations ; type 1 effect, physiological and biochemical effect without morphological damage to eggshell, with visualization of hyphae adhered to eggshell; type 2 effect, lytic effect with morphological changes in embryo and eggshell, without hyphal penetration through the eggshell; type 3 effect, lytic effect with morphological changes in embryo and eggshell, with hyphal penetration and internal egg colonization.

Both ovicidal effect and percentage of eggs with inner larval development were defined on the Petri dishes that were incubated for 21 days. Data from each interval were analyzed by Friedman's nonparametric test at the 1% and 5% levels of significance. Data

underwent linear regression analysis to determine variation in types 1, 2 and 3 effects for each fungal isolate as interaction time between the isolates and *T. canis* eggs increased. (Ayres et al., 2003).

3. Results

Table 1 shows the percentage results for types 1, 2 and 3 effects after 7, 14 and 21 days for the groups treated with *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *P. lilacinus*, and for the control group (without fungi). Data analysis revealed difference ($p < 0.05$) on all observation days for types 1, 2 and 3 effects occurring in the groups that received treatment, as compared to the control group. Difference was found ($p < 0.05$) for the groups treated on the 7th day between *P. chlamydosporia* (isolate VC4) and *P. lilacinus* for type 1 effect only. There was no difference between the isolates ($p > 0.05$) for the other effects (Table 1). Difference ($p < 0.05$) was found after 14 days between *P. chlamydosporia* (VC1) and *P. lilacinus* for type 1 effect, and between *P. chlamydosporia* (VC4) and *P. lilacinus* for type 2 effect. There was no difference ($p > 0.05$) between the referred fungi for type 3 effect (Table 1). No difference was found ($p > 0.05$) between the fungi for either effect after 21 days. When the effects on each fungus were compared after 7, 14 and 21 days, no difference ($p > 0.05$) was found on either tested fungus for types 1, 2 and 3 effects after 14 and 21 days.

Table 1. Means and standard deviations of the ovicidal activity (types 1, 2 and 3 effects) of egg-killing fungi *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and CV4) and *Paecilomyces lilacinus*, and of the control group with fungi on embryonated *Toxocara canis* eggs on the 7th, 14th and 21st days of interaction.

Isolates	Effect Type 1*	Effect Type 2**	Effect Type 3***
7th days of interaction			
VC1	31.8 ^{A,B} ± 6.88	20.0 ^A ± 1.41	13.8 ^A ± 1.17
VC4	25.2 ^A ± 5.15	20.7 ^A ± 2.66	15.2 ^A ± 2,04
<i>P. lilacinus</i>	47.3 ^B ± 7.53	17.3 ^A ± 1.63	12.3 ^A ± 3.20
Control	0.0 ^C ± 0.00	0.0 ^C ± 0.00	0.0 ^C ± 0.00
14th days of interaction			
VC1	27.3 ^A ± 2.94	26.8 ^{A,B} ± 4.26	20.5 ^A ± 3.78
VC4	30.3 ^{A,B} ± 3.67	33.2 ^A ± 2.93	19.0 ^A ± 2.10
<i>P. lilacinus</i>	35.7 ^B ± 3.83	24.7 ^B ± 3.88	18.8 ^A ± 3.43
Control	0.0 ^C ± 0.00	0.0 ^C ± 0.00	0.0 ^C ± 0.00
21st days of interaction			
VC1	21.7 ^A ± 4.08	26.8 ^A ± 1.83	20.3 ^A ± 1.51
VC4	25.0 ^A ± 5.48	27.5 ^A ± 4.14	21.7 ^A ± 1.97
<i>P. lilacinus</i>	25.0 ^A ± 5.48	25.7 ^A ± 1.86	20.0 ^A ± 1.79
Control	0.0 ^B ± 0.00	0.0 ^B ± 0.0	0.0 ^B ± 0.00

Percentages followed by same letter (A, B, C) in the same column are not significantly different (P>0.05) - Friedman test.

* Physiological, biochemical effect without morphological damage to eggshell, with hyphae adhered to the shell

** Lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, without hyphal penetration through the eggshell.

*** Lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, besides hyphal penetration and internal colonization.

The comparison of the percentage of larvaed eggs shows a significant reduction (p<0.01) in the groups treated with the fungi, when compared to the control group (Fig. 1).

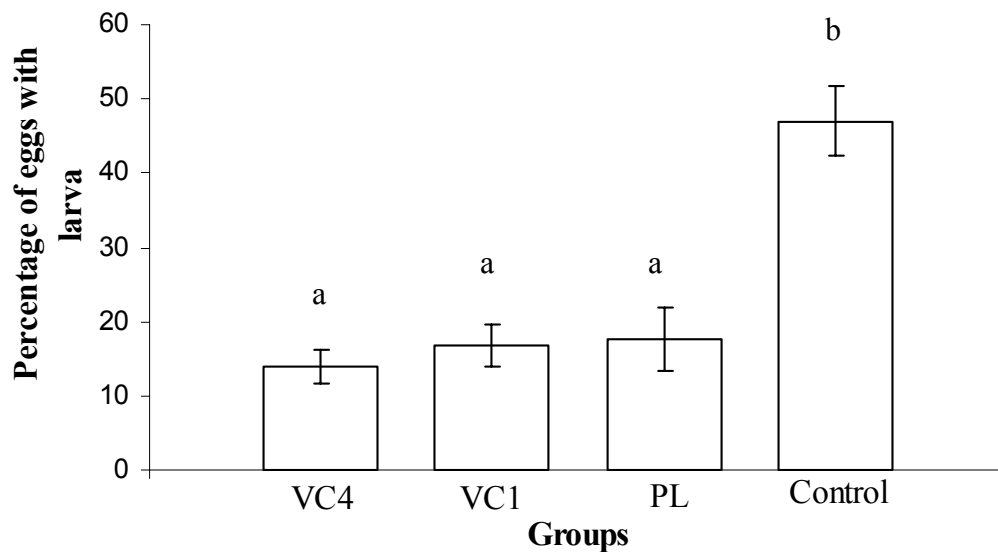


Fig.1. Means and standard deviations (bar) of the larvaed *Toxocara canis* eggs observed on the 21st day of interaction, in the groups that have *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* (PL) and in the control group without fungi. Percentages followed by the same small letters were not significantly different ($P < 0.01$) by the Friedman Test.

No presence of fungi was found in the control group (Figs. 2a and 2b). In the treated groups, there was hyphal penetration into the eggs (type 3 effect), but in the eggs containing larvae, these fungi were not able to kill the larvae. In the group treated with *P. chlamydosporia* (VC4), the presence of hatched eggs could be observed from the 14th day onwards (Fig. 2c); there was also the release of larvae (Fig. 2d). Eggs hatched from the 21st day could be seen in the group treated with *P. lilacinus* (Fig. 2e). There was no egg hatching in the group treated with *P. chlamydosporia* (VC1) during the experiment, but only hyphal penetration with internal colonization and morphological change in the egg (Fig. 2f).

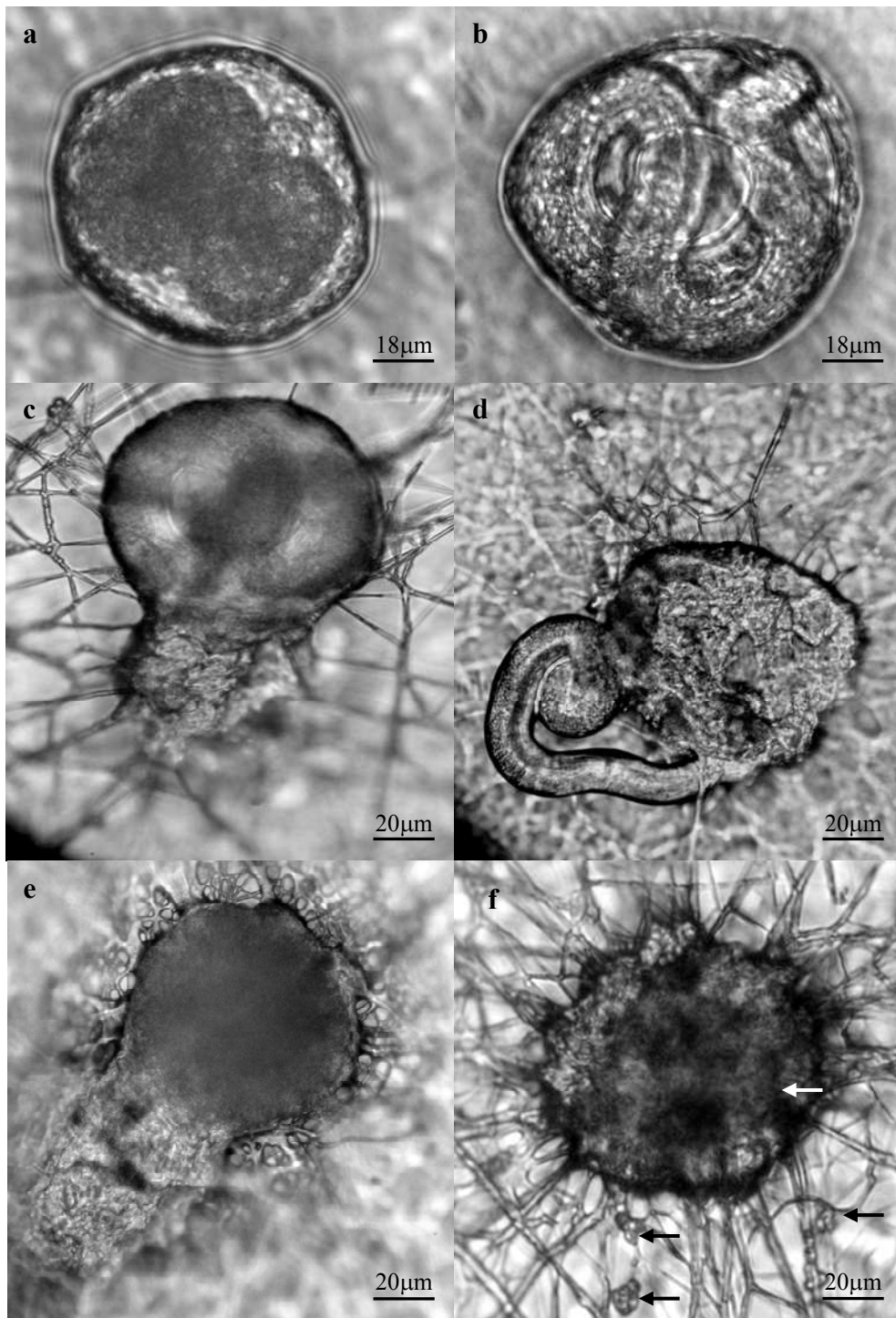


Fig. 2. (a) Embryonated *Toxocara canis* egg in the control group, without fungus (40x). (b). Larvaed *Toxocara canis* egg in the control group (40x). (c) *T. canis* egg hatched by the action of *P. chlamydosporia* isolate VC4 (40x). (d) *T. canis* egg hatched by the action of *P. chlamydosporia* (VC4) with release of the larva (40x). (e) Egg hatched by the action of *P. lilacinus* with content release (40x). (f) Predated egg (type 3 effect) by *P. chlamydosporia* isolate VC1 (white arrow), and presence of chlamydospores (black arrow) (40x).

The linear regression coefficients were calculated through the means of types 1, 2 and 3 effects of the fungal isolates on *T. canis* eggs. *P. chlamydosporia* (VC4) linear regression coefficients for effects types 1, 2 and 3 were -0.1, 3.4, 3.25. *P. chlamydosporia* (VC1) coefficients at the same effects were -5.05, 3.4 and 3.25 respectively. *P. lilacinus* showed linear regression coefficients of -11.15, 4.2 and 3.85 for types 1, 2 and 3 effects, respectively. Correlation was positive for types 2 and 3 effects in the tested fungi, and negative for type 1 effect for all fungi. The longer the interaction time between the fungus and *T. canis* eggs, the greater the types 2 and 3 effects and the lesser the type 1 effect.

4. Discussion

Ovicidal fungi *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *P. lilacinus* could efficiently predate *T. canis* eggs under laboratory conditions; there was no difference ($p>0.05$) between the fungi for type 3 effect at any of the tested intervals (7, 14 and 21 days) (Table 1). According to Lysek (1976), fungi are to be considered ovicidal if they present type 3 effect on the parasitized eggs, which happened to all the tested isolates. For *P. chlamydosporia* there was no percentage difference ($p>0.05$) regarding the ovicidal effect between isolates VC1 and VC4, even though isolate VC4 was more aggressive and caused the hatching of *T. canis* eggs (Fig 2c and 2d). As stated by Carneiro and Gomes (1993), variation may happen to the predatory capacity of eggs within the same species of ovicidal fungus, something that did not happen in this study.

The referred fungi have been successfully used in the *in vitro* control of helminthes eggs. Braga et al. (2008b) showed the effectiveness of isolates VC1 and VC4 of *P. chlamydosporia* on *F. hepatica* eggs at the intervals of 7, 14 and 21 days, with percentage rates for ovicidal activity, type 3 effect, above 20% at the end of the experiment for both isolates tested; no difference was found between them, and similar results were found in this study. In another study, Araújo et al. (1995) showed the action of *P. lilacinus* on *T. canis* eggs, with percentage rates after seven days reaching 45%, 15% and 16% for types 1, 2 and 3 effects, respectively. These results are in accordance with the present study.

The penetration mechanism of the ovicidal fungi into the parasitized eggs is not totally clear yet. According to Nordbring-Hertz (1988), these fungi mechanically penetrate helminth eggs through vegetative hyphae, with or without an association with the release of exoenzymes. However, Lysek and Sterba (1991) consider the enzymatic activity of

these fungi as one of the main elements in the process of attacking and penetrating the eggs.

This is the first report on the action of *P. chlamydosporia* on *T. canis* eggs. Although *T. canis* eggs are rather thick, the isolates of *P. chlamydosporia* could penetrate the egg and colonize it inside (Fig. 2f). According to Braga et al. (2007) frequency and success rate of egg penetration by fungi depend on the makeup of the egg cuticle. *T. canis* eggs are very resistant because they have a very thick protective shell made of five layers, which grants them resistance (Ayçüçek et al., 2001). *P. chlamydosporia* capacity to penetrate eggs with thick shells was also verified by Araújo et al. (2008) on *A. suum* eggs with percentage rates for isolates VC1 and VC4 of 19% and 20% after 21 interaction days and by Braga et al. (2007) on *A. lumbricoides* eggs with percentage rates for type 3 effect for isolates VC1 and VC4 of 30% and 26% after 14 days.

In addition to the ovicidal effect, all the tested fungi could reduce the rate of larva development inside *T. canis* eggs, which suggests that these isolates produce substances that affect embryo development. According to Monteiro et al. (1998) and Bittencourt et al. (1999), some ovicidal fungi produce toxic metabolites which directly affect the developing embryo and the hatching of larvae. Carneiro and Gomes (1993) verified that *P. lilacinus* and *P. fumosoroseus* act upon *Meloidogyne javanica* eggs yielding a 90% reduction in the hatching rate of these eggs.

According to the linear regression coefficients, correlation was positive for type 2 and 3 effects and negative for type 1 effect in all the tested fungal isolates. This shows that the longer the contact time between the fungus and the eggs, the more efficient the ovicidal activity of the fungus (Araújo et al. 2008).

5. Conclusion

These results reveal the *in vitro* effectiveness of fungi *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* on *T. canis* eggs under laboratory conditions. This fungus can be a promising alternative for future use in the biological control of *T. canis* eggs.

CONCLUSÕES GERAIS

Pode-se concluir que:

1. Não havendo diferença entre os tratamentos com os fungos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), *Arthrobotrys robusta* (I-31), *A. clododes* (CG719) e *A. conoides* (I-40) no controle das larvas (L₃) de *Ancylostoma* spp. *in vitro*.
2. Os isolados fúngicos *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34a), *A. robusta* (I-31) sobreviveram à passagem pelo trato intestinal de cães sem perder a capacidade de predação de larvas (L₃) de *Ancylostoma* spp. Porém, como apenas o isolado *M. thaumasium* se manteve eficaz nas amostras de fezes coletadas nos tempos de 72 e 96 horas após administração dos fungos, o *M. thaumasium* foi escolhido para ser utilizado no teste a campo (*in vivo*).
4. A utilização do fungo predador *M. thaumasium* (NF34a) no controle ambiental de larvas de *Ancylostoma* spp. se mostrou eficaz, pois foi capaz de reduzir a reinfecção dos animais e a contaminação ambiental.
5. Os fungos *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) e *Paecilomyces lilacinus* foram igualmente eficazes no controle, *in vitro*, de ovos de *Toxocara canis* apresentando ação ovicida direta (colonização do ovo) e indireta, inibindo ou retardando o desenvolvimento de larvas no interior dos ovos de *T. canis*.
6. O uso de fungos nematófagos pode servir como uma alternativa no controle de helmintos de cães

APÊNDICE

METODOLOGIAS

1. Teste *in vitro* da eficácia de fungos nematófagos

1.1. Organismos

Foram utilizados os isolados de fungos predadores de nematóides *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *M. appendiculatum*, *M. sinense*, *Arthrobotrys conoides*, *A. clododes*, *A. robusta* oriundos de solo do Brasil, na localidade de Viçosa na zona da mata de Minas Gerais. Os isolados foram obtidos pelo método de espalhamento do solo de Duddington (1955), modificado por Santos et.al. (1991). Esses fungos são mantidos em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%), a 4°C e no escuro.

Para induzir a produção de conídeos pelos isolados fúngicos, discos de cultura de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo o fungo foram transferidos para placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro contendo batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), que foram mantidos a 25°C, no escuro e por 10 dias. Após este período 5 ml de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri, e com a ajuda de um pincel os conídios e fragmentos de micélios foram removidos e estocados em pequenos frascos, 4°C.

As larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma* spp. foram obtidas das fezes de cães naturalmente infectados, através de coprocultura, por 15 dias, e posterior utilização do funil de Baermann, colocando-se água a 42-45°C, aguardando-se 12h.

1.2. Ensaio experimental

Para se estudar a atividade predatória dos fungos sobre L₃ de *Ancylostoma* spp., foram formados um grupo tratado, para cada espécie fúngica, constituído por 1.000 conídios e 10.000 L₃ e um grupo controle com 10.000 L₃, com seis repetições para cada grupo. O fungo e as larvas infectantes foram depositados sobre placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água 2% (AA 2%), marcados previamente com perfuradores de ágar, formando campos de 4 mm de diâmetro sobre a superfície (Araújo *et al.*, 2006a).

As placas de Petri foram mantidas em estufa à temperatura de 25°C, no escuro. Diariamente, por um período de 10 dias, as placas dos dois grupos foram observados ao

microscópio óptico (aumento de 100 e 200x), escolhendo-se, aleatoriamente, 10 campos, sendo tomado o número de larvas infectantes livres de predação pelos fungos. O número de L₃ foi convertida em média por campo de 4 mm de diâmetro e, posteriormente, tomada a média de seis repetições. A eficácia da predação exercida pelos isolados fúngicos sobre as L₃ foi realizada, comparando as médias obtidas dos grupos (tratados e controle) pela análise de variância seguido do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Ao fim de 10 dias, as L₃ foram recuperadas do ágar com auxílio do funil de Baermann, colocando-se água a 42-45°C e aguardando-se 12 horas para decantação. As L₃ foram contadas com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) obtendo o número médio de L₃ recuperadas das placas do grupo controle e os números médios de L₃ não predadas nas placas dos grupos tratados (Araújo *et al.*, 2006a).

1.3. Análise dos dados

Estes resultados foram submetidos a análise de variância (teste F e Tukey) a níveis de 1 e 5% de probabilidade (Ayres *et al.*, 2003). A análise estatística foi realizada com auxílio do programa BioEstat 5.0. O cálculo do percentual de redução das médias de L₃ nos grupos tratados foi feita pela seguinte fórmula:

$$\text{Redução(\%)} = \left(\frac{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas do grupo controle} - \text{Média de L}_3 \text{ recuperadas do grupo tratado}}{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas do grupo controle}} \right) \times 100$$

2. Teste de passagem através do trato gastrointestinal de cães

2.1. Organismos

Para testar a eficácia de fungos nematófagos sobre L₃ de *Ancylostoma* spp. após a passagem através do trato gastrointestinal de cães, foram utilizados os três melhores fungos predadores das larvas L₃, selecionados no ensaio *in vitro*. Sendo utilizado os isolados fúngicos *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34a) e *A. robusta* (I-31).

A fim de induzir a formação de micélio fúngico, discos de cultura de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram transferidos para ernemeyer de 250 ml, contendo 150 ml de meio líquido GPY (glicose, pectina de soja e levedura), e foram

mantidos sob agitação de 120 rpm, no escuro e na temperatura de 26°C por 10 dias. Após esse período, os micélios foram retirados, filtrados e pesados em balança analítica.

Nesse ensaio foram utilizados 24 cães adultos, sem raça definida, com média de peso de 14 Kg (variando de 11 a 17 Kg.). Os animais foram vermifugados com Pamoato de Pirantel a 14.4 mg/Kg de peso vivo, Praziquantel a 5mg/Kg de peso vivo e Febantel a 15mg/Kg de peso vivo (Drontal Plus ® Bayer, São Paulo-SP, Brazil), 15 dias antes de receberem os micélios fúngicos.

2.2. Ensaio experimental

Os cães foram confinados e separados aleatoriamente em três grupos tratados com fungos e um grupo controle (sem fungo), cada grupo com 6 cães. Eles receberam água e ração comercial para cães (18% de proteína bruta, 6% de estrato etéreo, 6,5% de matéria fibrosa e 12% de umidade) à vontade. Os animais dos grupos tratados receberam, por via oral, 1g de micélio fúngico por quilograma de peso vivo, misturados a igual proporção de ração comercial úmida em lata para cães com 8% de proteína bruta, 4% de estrato etéreo, 1,5% de matéria fibrosa e 80% de umidade. No grupo controle, os animais receberam, por via oral, 1g de ração comercial úmida em lata para cães por quilograma de peso vivo, sem micélios fúngicos (placebo).

Amostras fecais foram coletadas as 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração dos tratamentos com fungo e sem fungo. Posteriormente, as amostras coletadas de cada grupo de animais foram homogeneizadas, sendo removidas 2g de fezes e colocadas em placas de Petri com 5cm de diâmetro contendo AA 2%, acondicionadas em estufa a 25°C e no escuro. Nestas placas foram espalhados 1.000 L₃ de *Ancylostoma* spp.

De cada horário estabelecido foram realizadas cinco repetições para cada grupo de tratamento e para o controle. Diariamente, as placas foram observadas para a pesquisa de conídios e conidióforos característicos dos isolados testados, analisados segundo as chaves de classificação proposta por Van Oorschot (1985) e por Liu e Zhang (1994). No décimo quinto dia, foram recuperadas as L₃ não predadas das placas de Petri pela técnica de Baermann. As larvas foram quantificadas, obtendo a média de L₃ não predadas por placa.

2.3. Análise dos dados

Os dados foram submetidos a análise de variância seguido do teste de comparação de média, Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade (Ayres et al., 2003). A análise estatística foi realizada com auxílio do programa BioEstat 5.0. Para avaliar o efeito dos

tratamentos ao longo do tempo de acompanhamento, foi utilizada a análise de regressão linear.

3. Ensaio experimental *in vivo*

3.1. Local do estudo

O teste foi realizado na Sociedade Viçosense de Proteção Animal (SOVIPA), na cidade de Viçosa, latitude 20°45'14" Sul, longitude 42°52'55" Oeste, no estado de Minas Gerais, Brasil, no período de 01 de Março a 15 de Setembro de 2008.

3.2. Organismos

Foi utilizado o fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34a), proveniente do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil e foi mantido em tubos de ensaio contendo CMA 2% , a 4°C e no escuro.

A fim de induzir a formação de micélio fúngico, discos de cultura de aproximadamente 4mm de diâmetro, do fungo crescido em AA2% após 7 dias, a 25°C e no escuro , foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250ml, contendo 150ml de meio líquido GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura), sob agitação de 120 rpm, no escuro, em temperatura de 26°C e por 10 dias. Após esse período, os micélios foram retirados, filtrados e pesados em balança analítica.

3.3. Grupos de cães

Doze cães adultos (mais de 1 ano de idade) sem raça definida, sendo seis machos e seis fêmeas com média de peso de 13Kg (variando de 07 a 19 Kg) foram divididos em dois canis com 128m² cada, formando um grupo controle (sem tratamento fúngico) e um grupo tratado com o fungo *M. thaumasium* (isolado NF34a). Os animais receberam água e ração comercial para cães (18% de proteína bruta, 6% de extrato etéreo, 6,5% de matéria fibrosa e 12% de umidade) à vontade.

Cada canil possuía um abrigo de alvenaria e uma área gramada (*Axonopus afinis*) com aproximadamente 105m². Esses canis apresentaram um histórico de criação intensiva de cães por 8 anos e estavam naturalmente infectados por ovos e larvas de *Ancylostoma* sp.

Os cães foram tratados previamente com uma dose de anti-helmíntico (pamoato de pirantel, febantel e praziquantel) e após 15 dias (período de carência) cada animal do grupo

tratado recebeu 0,5g de micélio fúngico por quilograma de peso vivo misturado a igual proporção de ração comercial úmida para cães com 8% de proteína bruta, 4% de extrato etéreo, 1,5% de matéria fibrosa e 80% de umidade. Os tratamentos foram feitos duas vezes por semana (na segunda e na quinta feira) por um período de seis meses. No grupo controle os animais receberão apenas 0,5g de ração úmida por quilograma de peso vivo nos mesmos dias do grupo tratado.

3.4. Exames

Duas vezes por semana (na segunda e na quinta feira) foram coletadas amostras de fezes de todos os cães de cada canil, posteriormente, as fezes foram misturadas formando uma amostra de 100g de fezes para cada grupo (canil). Nestas amostras fecais, foram determinadas as contagens de ovos por grama de fezes (OPG), segundo Gordon e Whitlock (1939). Paralelamente ao exame de OPG, foram realizadas as coproculturas em que 20g de fezes foram misturadas com vermiculita, umedecidas e armazenadas em estufa à 26°C por 15 dias, para a obtenção de L₃ de *Ancylostoma* sp.

Amostras de 2g de fezes foram distribuídas em 10 placas de Petri contendo AA 2%, acrescido de 1.000 *Panagrellus* spp. e colocadas em estufa a 25°C durante dez dias, para verificar a passagem do fungo através do aparelho gastrintestinal dos cães e crescimento nas fezes.

A cada 15 dias, em cada canil dos grupos de animais, foram coletadas amostras da superfície do solo (até 2 cm de profundidade), de pontos variados. As amostras de cada canil foram misturadas, sendo utilizado 60 g de solo, de cada canil, para a pesquisa das L₃ de *Ancylostoma* sp. no solo. Essas larvas foram recuperadas com auxílio do funil de Baermann, colocando-se água com temperatura inicial de 42 a 45°C, depositando o solo envolto por três camadas de gaze e aguardando 12 horas para decantação.

Mensalmente, os cães foram pesados para a adequação da quantidade de micélio fúngico e ração úmida administrados por animal e para comparar o ganho de peso entre os grupos de animais.

3.5. Análise dos dados

Foram registrados os dados meteorológicos referentes ao período de 01 de Março a 15 de Setembro de 2008 em estação meteorológica especializada.

Para análise estatística os dados do OPG, das coproculturas e número de larvas recuperadas do solo foram transformados em log x+1 e submetidos à análise de variância e

teste de Tukey em nível de 1 e 5% de probabilidade. Os dados dos OPG, das coproculturas e o número de larvas recuperadas do solo foram submetidos a análise de regressão linear para determinar a correlação dos dados nos meses do experimento (Ayres et al., 2003). Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

4. Eficácia dos fungos parasitos de ovos

4.1. Fungos

Foram utilizados os isolados de fungos parasitos de ovos oriundos de solo do Brasil, o *Pochonia chlamydosporium* (sin. *Verticillium chlamydosporium*) isolados VC1 e VC4 provenientes do solo da localidade de Viçosa, na zona da mata de Minas Gerais, e o *Paecilomyces lilacinus* de solo do município de Jaboticabal, no estado de São Paulo. Mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA2%) a 4°C e no escuro.

4.2. Ovos embrionados de *Toxocara canis*

Ovos de *T. canis* foram obtidos pela dissecação do útero de fêmeas adultas de *T. canis* obtidas após vermifugação de cães, com pamoato de pirantel (Vermex suspensão[®], Indubrás S.A.). Os ovos foram lavados 10 vezes em água destilada por centrifugação a 1.000 rpm por 5 minutos cada vez, desprezando-se o sobrenadante ao fim de cada centrifugação. Posteriormente, os ovos foram incubados a 25°C, por 14 dias em solução contendo 0,05% de formalina, 0,005% de sulfato de streptomina e 0,01% de cloranfenicol, para que se tornassem embrionados. Após este período foi repetido o processo de lavagem em água destilada como descrito acima e estes ovos foram analisados morfológicamente em microscópio de luz (aumento de 100x).

4.3. Teste *in vitro*

Discos de cultura de 4mm de diâmetro foram extraídos de isolados fúngicos mantidos em tubos de ensaio contendo CMA 2% e transferidos para placas de Petri de 8,5cm de diâmetro contendo 20ml de BDA 2% mantidos a 25° C, no escuro e durante 10 dias. Após o crescimento dos fungos, novos discos de cultura de 4mm de diâmetro, de cada um dos isolados fúngicos foram colocados em placas de Petri, de 8,5cm de diâmetro,

contendo 20ml de meio de cultura AA2% e mantidos a 25°C, no escuro, durante 10 dias. O grupo controle foi constituído por placas de Petri sem fungo, contendo apenas o meio AA 2%. Foram utilizadas 18 placas para cada fungo e para o controle.

Após o crescimento dos fungos, 1.000 ovos embrionados foram vertidos sobre cada placa dos isolados fúngicos e sobre as placas controle e foram incubadas, a 25°C, por 7, 14 e 21 dias sendo 6 placas de cada grupo por período . Após estes períodos, 100 ovos foram removidos de cada placa contendo os isolados fúngicos e do controle (sem fungo), com a ajuda de uma espátula e colocados sobre a superfície de lâminas contendo uma gota de azul de Aman e avaliados em microscópio óptico (aumento de 400x) para a classificação, percentual, quanto ao efeito ovicida segundo os parâmetros estabelecidos por Lysek (1976): sem alterações; efeito tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem alteração morfológica da casca do ovo, onde são visualizadas as hifas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Nas placas de Petri incubadas por 21 dias, além do efeito ovicida, foi determinado o percentual de ovos (sem alterações) que tiveram o desenvolvimento de larvas no seu interior.

4.4. Análise dos dados

Os dados de cada intervalo foram analisados pelo método não paramétrico de Friedman em nível de 1 e 5% de significância. Os dados foram submetidos a análise de regressão linear para determinar a variação dos efeitos tipo 1, 2 e 3 para cada isolado fungico com o aumento do tempo de interação destes com os ovos de *T. canis*. (Ayres et al.,2003). Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-SANTOS, A.M.; ANDRADE, L.D.; MADEIROS, Z.; CHIEFFI, P.P.; LESCANO, Z.S.; PEREZ, E.P. Human Toxocariasis: frequency of anti-*Toxocara* antibodies in children and adolescents from an outpatient clinic for lymphatic filariasis in Recife, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.2, p.81-85, 2004.
- AHMAN, J.; JOHANSSON, T.; OLSSOM, M.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J.; TUNLID, A. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3408-3415, 2002.
- ALDAWEK, A.M.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; KOLODZIEYSKI, L.; SEVEIKOVÁ, Z.; DUBINSKÝ, P. Larval toxocarosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.3, p.207-214, 2002.
- ALTAMIRANO, M.P.T.; CARRASCO, A. J.; CABRERA, R. Prevalência de helmintos enteroparasitos zoonóticos y factores asociados em *Canis familiaris* em uma zona urbana de la ciudad de Ica, Peru. **Parasitologia Latinoamericana**, v.58, n.3-4, p.136-141, 2003.
- ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação de fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p.568-573, 2003.
- ARAÚJO, J.V. Controle de nematóides parasitas de bovinos por fungos nematófagos. Uma nova alternativa? **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v.30, p.75-88, 1999.
- ARAÚJO, R.F.; ARAÚJO, P.C.; WERNECK, R.M.; GÓRSKI, A. Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em áreas do Centro-Oeste do Brasil. **Revista. Saúde Pública**, v.34, n.1, p.84-85, 2000.
- ARAÚJO, J.M., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., CAMPOS, A.K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, v.121, n.1, p.338-341, 2009.
- ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.373-380, 2006a.

ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., MILANI, J.A., SILVA, A.S., TAVELA, A.O.,. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v.102, n.4, p.787-790, 2008.

ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.2, p.76-79, 2006b.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta* **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

Araujo, R.N.; Lima W.S. Infecções helmínticas em um rebanho leiteiro na região Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl.2, p.186-193, 2005.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.0, p. 165-169, 2004.

ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (nematoda: *Trichostrongyloidea*) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.2, p.76-81, 2003.

ARAÚJO, J.V., RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W., VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.

ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, W.M.; VASCONCELLOS, R.S.; CAMPOS, A.K. Effects of different temperatures and mineral salt on “pellets” of *Monacrosporium thaumasium* - a nematode - trapping fungus. **Veterinarisk Arhiv**, v. 70, n. 4, p. 181-190, 2000.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal of Helminthology**, v.67, n.3, p.136-138, 1993.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.1, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Veterinarski Arhiv**, v.2, n.2, p.69-78, 1999.

ASSIS, R.C.L.; ARAÚJO, J.V. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.3, p.109-113, 2003.

AYÇÜÇEK, H., YARSAN, E., SARIMEHMETOĞLU, H.O., KSELİ, M.T., NOGAY GÜRGÜNKARDESLER, N., ZYURT, N. Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v.31, n.1, p.35-39, 2001.

AYRES, M., AYRES, J.R.M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S., **Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2003, 290p.

BALAN, J.; GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactiloides*. **Nematológica**, v.18, n.1, p.163-173, 1972.

BARRON, G.L. **The nematode-destroying fungi. Topics in microbiology**. Guelph, Canadá: Canadian Biological Publications, 1977, 140p.

BARRON, G.L.; THORN, R.G. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany**, v.65, n., p.774-778, 1987.

BASUALDO, J.A.; CIARMELA, M.L.; SARMIENTO, P.L. AND MINVIELLE, M.C. Biological activity of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.854-859, 2000.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.351-354, 1999.

BLAZIUS, R.A.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J.S.; ROMÃO, P.R.T.; SILVA, O.S. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.38, n.1, p.73-74, 2005.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.S.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação in vitro dos isolados *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, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.6, p.686-688, 2008a.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.8, p.1559-1564, 2008b.

BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; TAVELA, A.O.; FERREIRA, S.R. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. **Journal of Helminthology**, v.83, n.4, p.303-308, 2009.

BRENNER, M.A.; PATEL, M.B. Cutaneous larva migrans: the creeping eruption. **Cutis**, v.72, n.2, p.111-115, 2003.

Bowman, D.D. Georges' **Parasitology for Veterinarians**, Elsevier Inc., New York, NY, EUA, 8 ed., 2003, 223p.

BURROWS, C.F.; BATT, R.M.; SHERDING, R.G. Disease of the small intestine .In: ETTINGER, S. J. and FELDMAN, E. C., **Textbook of Veterinary Internal Medicine Disease of the dog and cat**, 4 ed., v. 2, W B Saunders Company, 1995.

CAMPOS, F. F.; ALARCÓN, G. J. C. Frecuencia de helmintos em intestinos de perros sin dueño sacrificados em la ciudade de Querétaro, Querétaro, México. **Veterinaria México**, v.33, n.3, p.247-253, 2002.

CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.2, p.113-121, 1992.

CARNEIRO, R.M.G.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecylomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.7, n.1, p.66-75, 1993.

CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* spp.: evaluation *in vitro* and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal of Helminthology**, 83, n.3, 231-236, 2009.

CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.C.; ANJOS, D.H.S.; ORNELA, E.I.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGES, M.L.A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda- Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.2, p.53-57, 2003.

CASTRO, J.M.; SANTOS, S.V.; MONTEIRO, N.A. Contamination of public gardens along seafrent of Praia Grande City, São Paulo, Brazil, by *Ancylostoma* and *Toxocara* in dogs feces. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.2, n.38, p.199-201, 2005.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T.; ZAHARI, W.M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.3, p.173-183, 2003.

CHÁVEZ, A.V.; CASAS, E.A.; CAJAS, J.U.; VELARDE, J.O. Contaminación de parques públicos com huevos de *Toxocara* spp. em los distritos de la Provincia Constitucional del Callao y del Cono Sur de Lima Metropolitana. **Revista. Investigación Veterinária Peru**, v.11, n.1, p.52-57, 2000.

CHIEFFI, P.P.; UEDA, M.; CAMARGO, SOUZA, A.M.C.; GUEDES, M.L.S.; GERBI, L.J.; SPIR, M.; MOREIRA, A.S. Visceral larva migrans: a seroepidemiological survey in five municipalities of São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n.3 p.204-210, 1990.

CIARMELA, M.L.; BASUALDO, F.; BASUALDO, J.A. Biological control of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.854-859, 2000.

CIARMELA, M.L.; LORI, M.G.; BASUALDO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.251-257, 2002.

CIARMELA, M.L.; THEVENET, P.S.; ALVAREZ, H.M.; MINVIELLE, M.C. AND BASUALDO, J.A. Effect of *Paecilomyces lilacinus* on the viability of oncospheres of *Taenia hydatigena*. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.61-64, 2005.

CHÁVEZ, A.V.; CASAS, E.A.; CAJAS, J.U.; VELARDE, J.O. Contaminación de parques públicos com huevos de *Toxocara* spp. em los distritos de la Provincia Constitucional del Callao y del Cono Sur de Lima Metropolitana. **Revista. Investigación Veterinária Peru**, v.11, n.1, p.52-57, 2000.

CHEN, S.Y., DICKSON, D.W. & MITCHELL, D.J. Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. **Journal of Nematology**, v.32, n.2, p.190-197, 2000.

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

COSTA, M.J.N. **Filtrados de culturas fúngicas e esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood** (Tese de Mestrado). Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2000.

COSTA, M. J. M.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extrato de plantas e de esterco. **Nematologia Brasileira**, v.26, n.1, p. 5-12, 2002.

CROMPTON, D.W.T. How much human helminthiasis is there in the world? **Journal of Parasitology**, v.85, n.3, p.397-403, 1999.

CURY, M.C.; LIMA, W.S. Helminhos de cães e gatos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.39, p.12-35, 2002.

DEL GIUDICE, P.; DESALVADO, F.; BERNARD, E.; CAUMES, E.; VANDENBOS, F.; MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; DELLAMONICA, P., Loeffler's syndrome and cutaneous larva migrans: a rare association. **British Journal of Dermatology**, v.147, n.2, p.386-388, 2002

DEN BELDER, E., JANSEN, E. The influence of temperature, nutrition, light and the growth time of the mycelium on capture and infection of *Meloidogyne hapla* by *Arthrobotrys oligospora*. **Fundamental and Applied Nematology**, v.17, n.1, p.57-66, 1994.

DIAS, W.P.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Detecção, isolamento e identificação de fungos predadores de nematóides em amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. **Revista Ceres**. v.42, n.244, p. 615-620, 1995.

DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2-3, p.192-209, 2003.

DUDDINGTON, C.L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. v.38, p.97-103, 1955.

DUNN, M.T.; SAYRE, R.M.; CARRELL, A.; WERGIN, W.P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scanning Electron Microscopy*, v.3, p.1351-1357, 1982.

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, 2002.

FENOY, S.; CUELLAR, C; SCAGLIA, J.L. Soroprevalence of toxocaríasis in children and adults in Madrid and Tenerife, Spain. **Journal of Helminthology**, v.70, n.2, p.109-113, 1996.

FREITAS, M.G. **Helminthologia Veterinária**, Editora Gráfica Rabelo LTDA, Belo Horizonte, 4 ed., 238 p., 1980.

FORTES, E. Parasitologia Veterinária. 4ª Edição. São Paulo: Icone, 2004, 607p.

GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENA, H.F.J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, p.87-91, 1999.

GILLESPIE, S.H. The Epidemiology of *Toxocara canis*. **Parasitology Today**, v.4, n.6, p.180-182, 1988.

GOMES, A.P.S. **Controle biológico *in vivo* de nematódeos paratitos gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Arthrobotrys robusta* e atividade *in vitro* de isolados de fungos *Monacrosporium* sobre nematódeos**. Viçosa: UFV, 1998, 81p., Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Gordon, H.M., Whitlock, H.V., A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.12, n.1, 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**. Jaboticabal: UNESP, 2004. 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2004.

GRAY, N.F., Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Review**, v.62, n.4, p.245-304, 1987.

GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR JR., G.O. & JANSSON, H.B. **Disease of nematodes**, v.2, n.1, p.3-38, 1988.

GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S.A., LARSEN, M., NANSEN, P. E WOLSTRUP, J., Biological control. 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.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRECIANI, J.; RAWATE, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, n.4, p.291-297, 1996b.

GUARDIS, M.V.; RADMAN, N.E.; BURGOS, L.; FONROUGE, R.D.; ARCHELLI, S.M. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paratênico. **Parasitology Latinoamerican**, v.57, n.1-2, p.46-49, 2002.

GUEGLIO, B.; GENTILE, L.; NGUYEN, J.M.; ACHARD, J.; CHABASSE, D.; MARJOLET, M. Epidemiology approach to human toxocariasis in Western France. **Parasitology Research**, v.80, n.6, p.531-536. 1994.

HALLMAN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, n2, p.155-162, 1996.

HEUKELBACH, J.; WILCKE, T.; MÉIER, A.; MOURA, R.C.S.; FELDMEIER, H. A longitudinal study on cutaneous larva migrans in an impoverished Brazilian township. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.1, n.4, p.213-218, 2003.

HEUKELBACH, J.; WILCKE, T., FELDMEIER, H. Cutaneous larva migrans (creeping eruption) in an urban slum in Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.43, n.7, p.511-515, 2004

IBRAHIM, S.K., Distribution of carbohydrates on the cuticle of several developmental stages of *Meloydogne javanica*. **Nematologica**, v.37, p.275-284, 1991.

INAN, M.; SAKRU, N.; VATANSEVER, U.; BILGI, S. Visceral larva migrans presenting as acute abdomen in a child. **Journal of Pediatric Surgery**, v.41, p.e7-e9, 2006.

- JAFEE, B.A.; STORNG, D.R.; MULDOON, A.E. Nematode-trapping fungi of the a natural scrubland: tests for food chain involvement. **Mycologia**, v.88, n.4, p.444-564, 1996.
- JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection mechanisms in the fungus nematode system. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.B. **Diseases of nematode**, v. II. CRC Press, Boca Raton, USA, p.1-72, 1988.
- JATALA, P., Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annals Review Phytopathology**, v.24, p.453-489, 1986.
- JUNIPER, A.J. Dung as a source of predacious fungi. **Transaction British Mycological Society**, v.40, n.2, p.346-348, 1957
- KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA T.C.G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.175-184, 2007.
- KERRY, B.R.; BOURNE, J.M. A **Manual for Research on Verticillium chlamydosporium**, a Potencial Biological Control Agent for Root-knot Nematodes. IOBC, OILB, WPRS / SROP, 2002, 84 p.
- KERRY, B.R., SIMONN, A.; ROVIRA, A.D. Observations on the introductions of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, v.105, n.3, p.509-516. 1984.
- LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; FERREIRA, A.M.R.; ALMEIDA, N.K.O.; GUERRERO, J. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.133-139, 2004
- LABRUNA, M.B.; PENA, H.F.J.; SOUZA, S.L.P.; PINTER, A.; SILVA, J.C.R.; RAGOZO, A.M.A.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n.2, p. 183-193, 2006.
- LA MONDIA, J.A.; BRODIE, B.B. An observation chamber for evaluating potential biocontrol agents of *Globodera rostochiensis*. **Journal of Nematology**, v.16, n.1, p.112-15, 1984.
- LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.1, p.139-146, 1999.
- LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. **Parasitology**, v.120, n.1, p. 121-131, 2000.
- LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRANVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongylosis in grazing calves by means of the fungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.3-4, p.321-330, 1995.

LEITE, L.C.; MARINONI, L.P.; CÍRIO, S.M.; DINIZ, J.M.F.; SILVA, M.A.N.; LUZ, E.; MOLINARI, H.P.; VARGAS, C.S.G.; LEITE, S.C.; ZADOROSNEI, A.C.B.; VERONESI, E.M. Endoparasitas em cães (*Canis familiaris*) na cidade de Curitiba – Paraná – Brasil. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.9, n.2, p.95-99, 2004.

LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; LEITE, A.C.R. Custo benefício de diferentes dosificações anti-helmínticas em relação ao ganho de peso de bezerros de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.11, p.1333-1355, 1985.

LIU, X.; ZHANG, K. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycology Research**, v.98, n.7, p.862-868, 1994.

LYNCH, N.R.; EDDY, K.; HODGEN, A.N.; LOPEZ, R.I.; TURNER, K.J. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Tropical Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.2, p.275-281, 1988.

LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta University Palackiana Olomueensis**, v.76, n.1, p.9-13, 1976.

LYSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, N.C.; HERNÁNDEZ, N.LORENZO. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitologica**, v.29, n.3, p.265-270, 1982.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshelmintización del suelo. **Salud Pública de México**, v.31, n.6, p.763-771, 1989.

LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v.38, n.3, p.255-259, 1991.

MACIEL, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CECON, P.R. Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 71-75, 2006.

MANKAU, R. Biological control of nematodepests by natural enemies. **Annals Review Phytopathology**, v.18, p.415-440, 1980.

MANUELLI, P.R.; WALLER, P.J.; FAEDO, M.; MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Veterinary Parasitology**, v.81, n.1, p. 39-45, 1999.

MATOS, M.F.C.; MILITÃO, D.N.A.; BRUM, M.A.R.; OMAIS, M.; QUILIÃO, M.E.; DORVAL, M.E.C.; PEREIRA, A.C.; POSSI, L.A.; SAUER, L.; CAMARGO, E.D.; TUNDISI, R.N. Presence of anti-*Toxocara* antibodies in children selected at Hospital Universitário, Campo Grande, MS, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, n.1, p.49-50, 1997.

MCCARTHY, J.; MOORE, T. A. Emerging helminth zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1351-1360, 2000.

McNICHOLAS, J.; GILBEY, A.; RENNIE, A.; AHMEDZAI, S.; DONO, J.; ORMEROD, E. Pet ownership and human health: a brief review of evidence and issues. **British Medical Journal**, v.331, p.1252-1254, 2005.

MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Atividade predatória do do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.169-171, 2003.

MENDOZA-de-GIVES, P. **Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems**. Nottingham: University of Nottingham, 1999. 219 p. (Doctor of Philosophy Thesis).

MITTRA, S.; SASMAL, N.K.; SINHA, P.K. Infectivity of *Ancylostoma caninum* in dogs by different routes of inoculation. **Veterinary Parasitology**, v.16, n.3-4, p.289-293, 1984.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos entomopatogenicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (acarlixodidae). **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.461-466, 1998.

MOREIRA-SILVA, S.F.; LEÃO, M.E.; MENDONÇA, H.F.S.; PEREIRA, F.E.L. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of inpatients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.4, p.259-261, 1998.

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

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KABANA, R., Fungal biocontrol for the management of nematodes In: Veech, J.; Dickson, D.W.(eds), **Vistas on Nematology**. USA: Maryland, p.94-99, 1987.

MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V. Atividade predatória dos fungos *Arthrobotrys conoides* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. **Ciência Animal**, v.10, n.1, p.37-41, 2000.

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.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; WOLSTRUP, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and soil nematodes. **Proceeding Nematology**, v.53, n.2, p.237-243, 1986.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J.; HENRIKSEN, S. A.; JORGENSEN, R. J. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.325-335, 1988.

- NAGAKURA, K.; TACHIBANA, H.; KENEDA, Y.; KATO, Y. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. **The Journal of Infectious Disease**, v.160, p.735-736, 1989.
- NUNES, C. M.; PENA, F. C.; NEGRELLI, G. B.; ANJO, C. G.; NAKANO, M. M.; STOBBE, N. S. Presence of larva migrans in sand boxes of public elementary schools, Araçatuba, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, p.656-658, 2000.
- NODBRING-HERTZ, B., Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Micrabiology Sciences**, v.5, n.4, p.108-116, 1988.
- NODBRING-HERTZ, B.; MATTIASSON, B. Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. **Nature**, v.281, p.477-479, 1979.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n.1-2, p.19-27, 2002.
- 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.
- PÉREZ, R.M.L.; ARRIETA, L.D. C.; ZAMORA, E.M.R.; ROCHE, R.G.; DÍAZ, L.V.P. Toxocara sp. en parques y zonas públicas de Ciudad de la Habana, 1995. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v. 38, n. 2, p. 112-116, 2000.
- PRAMER, D., Nematode-trapping fungi. **Science**, v.144, n.3617, 382-388, 1964.
- PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. **The Lancet**, v.335, n.2, p.1299-1302, 1990.
- PROCIV, P.; CROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a “new” zoonoses. **Acta Tropica**, v.62, n.1, p.23-44, 1996
- RAMIREZ-BARRIOS, R.A.; MENA, G.B.; MUNOZ, J.; CUBILLAN, F.A.; HERNANDES, E.; GONZALES, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.1, p.11-20, 2004.
- RÉDUA, C.R.O. **Avaliação do fungo *Monacrosporium thaumasium* sobre nematóides estrogilídeos de equinos**. 2002, 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2002.
- RIBEIRO, V.M. Controle de helmintos de cães e gatos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.88-95, 2004.
- ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1369-1377, 2000.

ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes and Infection**, v.4, n.8, p.867–873, 2002.

SALEM, G.; SCHANTZ, P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. **Clinical Infectious Disease**, v.15, p.743-744, 1992.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F.; BERGAMO F. M. M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* spp., de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.6, p.529-532, 1998.

SANTARÉM, V. A.; GIUFFRIDA, R.; ASIN, G. A. Larva migrans cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larva de *Ancylostoma* spp. em parque público do município de Taciba, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.2, p.179-181, 2004.

SANTIAGO, D.C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J.F.V.; RIBEIRO, E.R.; GOMES, B.C.; SANTORO, P.H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1055-1064, 2006.

SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v.15, n.2, p.121-134, 1991.

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, n.1, p.63-70, 2000.

SAXENA, G.; MITTAL, N. Trap formation by conidia of nematode-trapping *Monacrosporium* spp. **Mycological Research**, v.99, n.7, p.839-840, 1995.

SCHANTZ, P.M. Parasitic Zoonoses in Perspective. **International Journal of Parasitology**, v.21, n.2, p.161-170, 1991.

SCHOLLER, M. and RUBNER, A. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. **Microbiological Research**, v. 149, n.1, p. 145-149, 1994.

SILVA, G.H.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, p.594-598, 2002.

SOULSBLY, E. J. L. **Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals**, published by Baillière Tindall, 7 ed., 1982.

STIRLING, G.R. **Biological Control of Plant Parasitic nematodes**. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 282pp, 1991.

STURCHILER, D.; WEISS, N.; GASSNER, M. Transmission of toxocaríasis. **The Journal of Infectious Disease**, v.162, p.571, 1990.

STIRLING, G.R.; SMITH, L.J. Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactiloydes* for biological control of root-knot nematodes. **Biological Control**, v.11, n.3, p. 231- 239, 1998.

SUN, M. H.; GAO, L.; SHI, Y.X.; LI, B.J.; LIU, X.Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 22-28, 2006.

TAIRA, K.; SAEED, I.; PERMIN, A.; KAPEL, C. M. O. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.1-2, p.115-124, 2004.

VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, v.26, n.1, p.61-95, 1985

VEENHUIS, M., NODBRING-HERTZ, B. E HARDER, W. An ultrastructural study of cell-cell interactions in capture organs of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology Letters**, v.30, p.93-98, 1985.

VELHO, P.E.N.F.; FARIA, A.V.; CINTRA, M.L.; SOUZA, E.M.; MORAES, A.M. Larva migrans: A case report and review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.3, p.167-171, 2003.

WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role the nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.23, n., p.539-546, 1993.

WOLFE, A.; WRIGHT, I.P. Human toxocariasis and direct contact with dogs. **Veterinary Record**, v.152, n.14, p.419-422, 2003.

ZARE, R.; GAMS, W. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. Rostaniha (**Botanical Journal of Iran**), Supplement 3, 188 p., 2004.

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L. Nematophagous species of *Monacrosporium* from China. **Mycological Research**, v.100, p.274-276, 1996b.

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L.; REN-HEN, G. A new species of *Arthrobotrys* from China. **Mycological Research**, v.100, p.527-530, 1996a.