

MARISA CAIXETA VALADÃO

**HELMINTOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS DE *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 CRIADOS EM SISTEMA EXTENSIVO – IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E CONTROLE BIOLÓGICO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

V136h  
2018 Valadão, Marisa Caixeta, 1986-  
Helmintos parasitos gastrintestinais de *Gallus gallus domesticus*  
Linnaeus, 1758 criados em sistema extensivo : identificação  
morfológica, molecular e controle biológico / Marisa Caixeta Valadão. -  
Viçosa, MG, 2018.  
ix, 57f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Galo - Doença. 2. Helmintologia veterinária. 3. Helminto -  
Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.  
II. Título.

CDD 22. ed. 636.50896962

MARISA CAIXETA VALADÃO

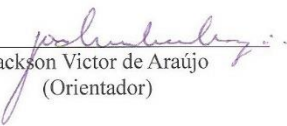
**HELMINTOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS DE *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 CRIADOS EM SISTEMA EXTENSIVO - IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E CONTROLE BIOLÓGICO**

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

APROVADA: 26 de novembro de 2018.

  
Mariana Costa Fausto

  
Artur Kanadani Campos

  
Jackson Victor de Araújo  
(Orientador)

“O conhecimento que não é aplicado está  
despojado de significado” (Whitehead)

**À minha futura cientista,  
Vitória Nunes Machado**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e oportunidade de estar concretizando meu sonho.

Aos meus pais, João e Lourdes e às irmãs Fernanda e Elisa que sempre acreditaram em meu potencial. Agradeço também ao meu cunhado Gustavo e à minha sobrinha Vitória pelo carinho e apoio nos momentos difíceis. Ao Cayo por mesmo distante, se fazer sempre presente em todos os momentos. Às minhas tias, primos, e amigos que torceram por mim. À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por me proporcionarem crescimento pessoal e profissional, sobretudo à Rosinéia, merecedora de todos os aplausos dos alunos e professores da pós.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do DVT-UFV pelo companheirismo e amizade de sempre. Em especial ao Samuel, José Geraldo, Ademir e Aloísio. Lugar onde fiz minha segunda morada.

Ao professor Jackson Victor de Araújo pela oportunidade, orientação e liberdade na condução dos estudos.

Ao professor e amigo de todas as horas Artur Kanadani Campos, meu exemplo de caráter e profissionalismo, ética e incentivo ao meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos de Viçosa que fizeram meus dias mais felizes e as risadas mais frequentes, em destaque, Lorendane Carvalho, Fabrício Valente, Lílian Cação e Rodrigo Barros.

À dona Marlene e sua família que me receberam sempre com carinho em sua residência durante todo o período de coletas. À Laura, pela centena de material doado à pesquisa.

Ao professor Arele Calderano do DZO e aos funcionários do aviário pelo auxílio e pelos animais cedidos ao experimento.

Ao professor Hudson Alves Pinto e ao pessoal do Laboratório de Biologia de Trematoda do Departamento de Parasitologia da UFMG pelo auxílio e ensinamentos prestados.

À professora Bernadete Miranda dos Santos e Francisco Edmar pela oportunidade de convívio e aprendizados durante a disciplina Doenças de Aves.

À Cláudia Maciel pelo amor e apoio dedicados a mim, e também à Letícia Álvares pelo suporte e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Aos companheiros do Camilo Chaves pelo carinho e amparo durante todo o tempo.

À minha cadelinha Joana, pelo amor, companheirismo e compreensão incondicional.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	2
OBJETIVOS.....	3
Objetivo Geral .....	3
Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
Helmintos parasitos gastrintestinais de <i>Gallus domesticus</i> criados em sistema extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3. RESULTADOS .....	10
4. DISCUSSÃO.....	11
5. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 .....	17
<i>Pochonia chlamydosporia</i> no controle biológico de nematódeos parasitos gastrintestinais de galinhas criadas em sistema extensivo no Brasil .....	17
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3. RESULTADOS .....	24
4. DISCUSSÃO.....	29
5. REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 3 .....	37
A molecular phylogenetic study of the cecal fluke of poultry, <i>Postharmostomum commutatum</i> (= <i>P. gallinum</i> ) (Trematoda: Brachylaimidae) .....	37
ABSTRACT .....	38

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>38</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>40</b>
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>41</b>
<b>5. REFERENCES.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

VALADÃO, Marisa Caixeta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2018. **Helmintos parasitos gastrintestinais de *Gallus Gallus Domesticus* Linnaeus, 1758 criados em sistema extensivo – identificação morfológica, molecular e controle biológico.** Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Os sistemas extensivos têm conquistado maior visibilidade com produtos diferenciados no mercado, devido à maior demanda do consumidor por produtos que aliem sustentabilidade e bem-estar animal. Todavia, tais criações expõem os animais a helmintos, aumentando o desafio e afetando a resposta imunológica das aves, causando óbitos nos animais e prejuízo econômico aos produtores. Os objetivos deste estudo são avaliar a ocorrência de helmintos parasitos gastrintestinais em aves criadas em sistemas extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; verificar o potencial ovicida do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* como controlador biológico de nematódeos e por fim; identificar sequências moleculares e caracterizar a posição filogenética do trematódeo *Postharmostomum commutatum*. Cento e noventa e um intestinos delgado e grosso e 38 proventrículos aves abatidas por produtores da microrregião de Viçosa, foram doados ao trabalho. Os helmintos encontrados foram separados e identificados seguindo chaves taxonômicas. De 160 aves positivas (83,8%), 118 apresentavam infecção por mais de um helminto. Um total de 6031 helmintos foram classificados em 13 espécies distintas, sendo 469 exemplares do nematódeo *Tetrameres* sp. encontrados parasitando os proventrículos. Os percentuais encontrados foram divididos entre nematódeos (73,3%), cestódeos (45,5%), e trematódeos (3,66%). Comparando os grupos de helmintos recuperados nos intestinos delgado e grosso, observou-se maior ocorrência (62,3%) e maior média de helmintos recuperados do nematódeo *Heterakis gallinarum* (22,7 helmintos/ave). Dentre os cestódeos, a espécie de maior ocorrência foi *Raillietina echinobothrida* (37,7%) e dentre os trematódeos, *P. commutatum* obteve maior percentual (3,1%). Afim de testar a resistência à passagem pelo trato gastrintestinal e capacidade ovicida de *P. chlamydosporia* sobre ovos de nematódeos, comparou-se o percentual de interação entre o isolado mantido em laboratório e recuperado após passagem pelo trato gastrintestinal de *G. domesticus* com ovos de *Ascaridia galli* e *H. gallinarum*. Para tanto, foram utilizadas 22 aves criadas em sistema extensivo e separadas em dois grupos (controle e tratado), sendo fornecida dose única do isolado fúngico crescido em substrato de milho triturado, com total de  $3,3 \times 10^6$  clamidósporos para o grupo tratado. Após a visualização de estruturas fúngicas

compatíveis com *P. chlamydosporia*, foram feitos novos repiques para outras placas de Petri contendo ágar-água 2% (5 placas por horário). Sendo mantidas condições idênticas para ambos os grupos, as placas foram incubadas por 10 dias a 25°C no escuro e após este período, 200 ovos de cada nematódeo foram transferidos para cada placa. O percentual de interação foi avaliado por meio de leituras ao microscópio de luz realizadas a cada 24 horas, por um período total de 144h. Nos tempos de interação 24 e 72h, *P. chlamydosporia* mantido em laboratório demonstrou percentual de interação igual a 35,0 e 81,1%, respectivamente, sobre ovos de *A. galli* e, 25,5 e 83,8% em 24 e 72h sobre ovos de *H. gallinarum*. Após passagem pelo trato gastrointestinal das aves, o isolado apresentou nas primeiras 24h, 6,4% de interação com ovos de *A. galli* e 2,0% com ovos de *H. gallinarum*. Em 72h de interação, apresentou 34,3% de interação com ovos de *A. galli* e 18,8% com ovos de *H. gallinarum*. Os maiores percentuais de interação foram observados no tempo de 144h de interação entre fungo-ovos em ambos os helmintos testados. Posteriormente, caracterizou-se o processo de interação entre o fungo e os ovos de *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. por microscopia eletrônica de varredura. Por fim, devido ao ciclo biológico complexo e importância médica veterinária potencial, as sequências moleculares dos genes 28S, ITS-2 e cox-1 do trematódeo *P. commutatum* foram avaliadas, afim de obter informações sobre a taxonomia deste parasito, uma vez que foram encontrados 50 espécimes adultos parasitando o cecos das aves doadas a este estudo (3,1%). Levantamentos parasitológicos devem ser específicos para cada região e este é o primeiro estudo que estima a fauna helmíntica gastrointestinal de *G. domesticus* criado em sistema extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O fungo helmintófago *P. chlamydosporia* demonstrou possibilidade de uso como controlador biológico, uma vez que é capaz de diminuir a contaminação ambiental, interagindo com ovos de nematódeos parasitos gastrointestinais de aves. A espécie *P. commutatum* (considerada sinônimo de *P. gallinum* Witenberg, 1923) forma uma linhagem isolada de outros membros da superfamília Brachylaimoidea, quando comparadas as sequências moleculares das espécies, suportando o status distinto do gênero. Espera-se que os resultados obtidos neste estudo contribuam para inquéritos epidemiológicos de parasitos de aves domésticas na região possam favorecer medidas profiláticas e de controle desses parasitos.

## ABSTRACT

VALADÃO, Marisa Caixeta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2018. **Gastrointestinal helminths parasites of *Gallus Gallus Domesticus* Linnaeus, 1758 raised in extensive system – morfological, molecular identification and biological control.** Adviser: Jackson Victor de Araújo.

Extensive systems have gained greater visibility with differentiated products in the market, due to the greater consumer demand for products that combine sustainability and animal welfare. However, such creations expose the animals to helminths, increasing the challenge and affecting the immune response of the birds, causing deaths in the animals and economic damage to the producers. The objectives of this study are to evaluate the occurrence of gastrointestinal helminth parasites in birds raised in extensive systems in the city of Vicoso, Minas Gerais, Brazil; to verify the ovicidal potential of the helminthophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* as biological control of nematodes and finally; to identify molecular sequences and characterize the phylogenetic position of the trematode *Postharmostomum commutatum*. One hundred and ninety-one small and large intestines and 38 proventricules of birds slaughtered by producers of the micro-region of Vicoso, were donated to work. The helminths were separated and identified following taxonomic keys. Of 160 positive birds (83.8%), 118 had infection with more than one helminth. A total of 6031 helminths were classified in 13 distinct species, being 469 specimens of the nematode *Tetrameres* sp. found parasitizing the proventricles. The percentages found were divided among nematodes (73.3%), cestodes (45.5%), and trematodes (3.66%). Comparing the groups of helminths recovered in the small and large intestines, we observed a higher occurrence (62.3%) and a higher average of helminths recovered from the nematode *Heterakis gallinarum* (22.7 helminths / bird). Among the cestodes, the species with the highest occurrence was *Raillietina echinobothrida* (37.7%) and among the trematodes, *P. commutatum* obtained a higher percentage (3.1%). In order to test the resistance to passage through the gastrointestinal tract and ovicidal capacity of *P. chlamydosporia* on eggs of nematodes, the percentage of interaction between the isolate kept in the laboratory and recovered after passage through the gastrointestinal tract of *G. domesticus* with eggs of *Ascaridia galli* and *H. gallinarum*. For this, 22 birds were raised in an extensive system and separated into two groups (control and treated). A single dose of the fungal isolate grown on crushed corn substrate was used, with a total of  $3.3 \times 10^6$  chlamydo-spores for the treated group. After visualization of fungal structures

compatible with *P. chlamydosporia*, new repiques were made for other petri dishes containing 2% water-agar (5 plates per hour). With identical conditions being maintained for both groups, the plates were incubated for 10 days at 25 ° C in the dark and after this period, 200 eggs from each nematode were transferred to each plate. The percentage of interaction was evaluated by means of light microscope readings performed every 24 hours, for a total period of 144h. At the interaction times 24 and 72h, *P. chlamydosporia* kept in the laboratory showed a percentage of interaction equal to 35.0 and 81.1%, respectively, on *A. galli* eggs and, 25.5 and 83.8% in 24 and 72 hours on *H. gallinarum* eggs. After passage through the gastrointestinal tract of the birds, the isolate presented in the first 24h, 6.4% interaction with *A. galli* eggs and 2.0% with *H. gallinarum* eggs. In 72h of interaction, it presented 34.3% interaction with *A. galli* eggs and 18.8% with *H. gallinarum* eggs. The highest percentages of interaction were observed in the 144h time of interaction between fungus-eggs in both helminths tested. Subsequently, the interaction process between the fungus and the eggs of *A. galli*, *H. gallinarum* and *Tetrameres* sp. by scanning electron microscopy. Finally, due to the complex biological cycle and potential veterinary medical importance, the molecular sequences of the 28S, ITS-2 and cox-1 genes of the trematode *P. commutatum* were evaluated in order to obtain information on the taxonomy of this parasite, since they were found 50 adult specimens parasitizing the ceca of birds donated to this study (3.1%). Parasitological surveys should be specific for each region and this is the first study to estimate the gastrointestinal helminth fauna of *G. domesticus* created in an extensive system in the municipality of Vicoso, Minas Gerais, Brazil. The helminthophagous fungus *P. chlamydosporia* showed the possibility of using it as a biological controller, since it is able to reduce environmental contamination by interacting with nematode eggs of gastrointestinal parasites of birds. The species *P. commutatum* (considered synonymous with *P. gallinum* Witenberg, 1923) forms an isolated lineage of other members of the superfamily Brachylaimoidea, when comparing the molecular sequences of the species, supporting the distinct status of the genus. It is hoped that the results obtained in this study contribute to epidemiological surveys of poultry parasites in the region that may favor prophylactic and control measures of these parasites.

## INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura é um dos pilares da economia brasileira. O país é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, sendo a maior parte desta produção destinada ao consumo interno, de acordo com Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). Mudanças na perspectiva do consumidor em relação ao bem-estar animal na produção e sustentabilidade tem favorecido as criações em sistemas extensivos ou semi-intensivos, que tem conquistado uma parcela significativa do mercado como resultado da demanda por produtos livres de resíduos químicos (Cardozo e Yamamura, 2004; Albino et al., 2005).

No sistema de criação extensivo, a alimentação por livre escolha, viabiliza maior ocorrência de endoparasitoses, ocasionando perdas econômicas significativas, como aumento na taxa de mortalidade e nos custos de profilaxia com administração de fármacos anti-helmínticos de elevado custo, além de contaminação ambiental (Silva et al., 2017).

Além do impacto na saúde e desenvolvimento das aves, é importante ressaltar a possibilidade de as aves domésticas serem potenciais reservatórios de patógenos de importância na medicina humana (Travassos et al., 1969; Costa et al., 1986; Fernandes et al., 2015). Nesse sentido, a busca por metodologias alternativas que auxiliem e fortaleçam o controle das helmintoses e descontaminação ambiental se faz necessária, como uso de controladores biológicos tais como fungos helmintófagos que são inofensivos aos animais e humanos e aptos a destruir formas ambientais de helmintos em curto prazo.

Dentre os helmintos de aves domésticas algumas espécies de trematódeos como *Postharmostomum commutatum* possuem ciclo biológico e taxonomia complexos, necessitando estudos mais aprofundados a fim de esclarecer possíveis vieses no diagnóstico correto das espécies. Embora a espécie tenha sido relatada em diferentes partes do mundo, não existem sequências moleculares disponíveis e sua posição filogenética é desconhecida em relação a outros membros da superfamília Brachylaimoidea.

O presente estudo objetivou contribuir para o conhecimento a respeito da fauna de helmintos gastrintestinais encontrados em aves criadas em sistema extensivo no município de Viçosa, bem como avaliar a capacidade ovicida do fungo helmintófago *P. chlamydosporia* sobre ovos de nematódeos e também caracterizar a posição filogenética do trematódeo *Postharmostomum commutatum* dentro da superfamília Brachylaimoidea.

## REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual, 2017**. Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 23/08/2018.

ALBINO, L.F.T.; NERY, L.R.; VARGAS JÚNIOR, J.G.; SILVA, J.H.V. **Criação de frango e galinha caipira: avicultura alternativa**. 2.ed, Aprenda Fácil, Viçosa-MG. 2005.

CARDOZO, S.P.; YAMAMURA, M.H. Parasitas em produções de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina: Ciênc. Agr.**, 25 (1): 63-74, 2004.

COSTA, H.M.A.; LEITE, A.C.R.; GUIMARÃES, M.P.; LIMA, W.S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, 38(4): 465-579, 1986.

FERNANDES, B.M.M.; JUSTO, M.C.N.; CÁRDENAS, M.Q.; COHEN, S.C. **South American Trematodes Parasites of Birds and Mammals**, Oficina de Livros, Rio de Janeiro, 2015.

SILVA, M.E.; SILVEIRA, W.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematicide activity of microfungi (Orbiliiales, Orbiliaceae) after transit through gastrointestinal tract of “*Gallus gallus domesticus*”. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, 18 (1): 1-9, 2017.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J.F.T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 67: 1-886, 1969.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Coletar e identificar helmintos parasitos gastrintestinais de galinhas criadas em sistema extensivo, avaliar a eficácia do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de nematódeos e identificar sequências moleculares do helminto *Postharmostomum commutatum*.

### Objetivos específicos

- Coletar e identificar helmintos parasitos gastrintestinais de *Gallus domesticus* criados em sistema extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais;
- Avaliar a capacidade do fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia* passar pelo trato gastrintestinal das galinhas e germinar após passagem nas fezes dos animais;
- Comparar percentual de interação entre o isolado fúngico VC4 mantido em laboratório e após sua recuperação nas das fezes das aves;
- Observar a interação entre fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* e ovos de nematódeos através da microscopia de luz e eletrônica de varredura;
- Identificar sequências moleculares do helminto *Postharmostomum commutatum* e sua posição filogenética em relação a outros membros da superfamília Brachylaimoidea.

## CAPÍTULO 1

---

**Helminthos parasitos gastrintestinais de *Gallus domesticus* criados em sistema extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil**

---

**Marisa Caixeta Valadão<sup>1</sup>, Ítalo Stoupa Vieira<sup>1</sup>, Lorendane Millena de Carvalho<sup>1</sup>, Paulo Henrique Neves<sup>1</sup>, Rafaela Teixeira Magalhães<sup>1</sup>, Artur Kanadani Campos<sup>1</sup>, Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## RESUMO

As helmintoses aumentam o desafio e afetam a resposta imunológica das aves domésticas. Embora a maioria das manifestações sejam subclínicas, as medidas de controle exercidas pelos produtores usualmente não são monitoradas e os relatos de helmintoses variam conforme características geoclimáticas de cada região. Os sistemas de criação extensivos possibilitam aos animais maior contato com solo e com hospedeiros intermediários, favorecendo elevada ocorrência de helmintos em *Gallus domesticus*. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de helmintos parasitos gastrintestinais em aves criadas em sistemas extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os intestinos delgado e grosso de 191 aves abatidas por produtores da microrregião de Viçosa, Minas Gerais, foram doados ao trabalho. Cada segmento do trato gastrintestinal examinado foi individualmente aberto com tesoura e lavado com água sobre uma peneira. Os helmintos encontrados foram separados em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo solução de cloreto de sódio a 0,9% e identificados seguindo chaves taxonômicas. Em 160 aves positivas (83,77%), 118 apresentavam infecção por mais de um helminto, ocorrendo predomínio de nematódeos (73,30%), cestódeos (45,50%), e menor percentual de ocorrência de trematódeos (3,66%). Um total de 5562 helmintos foram classificados em 12 espécies distintas. Comparando os grupos de helmintos recuperados, observou-se predomínio do grupo dos nematódeos, o qual obteve a maior média dentre as amostras (25,92 helmintos/ave). A espécie com maior ocorrência (62,30%) e recuperação de helmintos por ave foi o nematódeo *Heterakis gallinarum* (22,75 helmintos/ave). Dentre os cestódeos, a espécie com maior destaque foi *Raillietina echinobothrida* (37,30%), com média de 2,24 helmintos recuperados por ave. Embora não tenha sido observada diferença entre a média de espécies de trematódeos recuperados por ave, *Postharmostomum commutatum* obteve maior percentual de ocorrência (3,14%). A elevada ocorrência de helmintoses gastrintestinais associada à presença infecções mistas podem ser atribuídas às condições ambientais e manejo do sistema de criação. Apesar da escassez de dados sobre helmintoses de aves domésticas na literatura brasileira, assim como relatos de outros países, maior ocorrência de infecções por nematódeos e cestódeos em sistemas de criação de aves ao ar livre foi verificada neste estudo, condizendo com resultados encontrados por outros autores. Levantamentos parasitológicos devem ser específicos para cada região e este é o primeiro estudo que estima a fauna helmíntica gastrintestinal de *G. domesticus* criado em sistema extensivo

no município de Viçosa, Minas Gerais e espera-se que esses resultados contribuam para inquéritos epidemiológicos de parasitos de aves domésticas na região possam favorecer medidas profiláticas e de controle desses parasitos.

**Palavras-chaves:** aves domésticas, criação extensiva, helmintoses gastrintestinais

### ABSTRACT

Helminths increase the challenge and affect the immune response of poultry. Although most of the manifestations are subclinical, the control measures exerted by the producers are usually not monitored and the reports of helmintoses vary according to geoclimatic characteristics of each region. Extensive breeding systems allow animals to better contact with soil and intermediate hosts, favoring a high occurrence of helminths in *Gallus domesticus*. In this context, the objective of this study was to evaluate the occurrence of gastrointestinal helminth parasites in birds reared in extensive systems in the municipality of Vicoso, Minas Gerais, Brazil. The small and large intestines of 191 birds slaughtered by producers in the micro-region of Vicoso, Minas Gerais, were donated to work. Each segment of the examined gastrointestinal tract was individually opened with scissors and washed with water over a sieve. The helminths were separated in 9 cm diameter Petri dishes containing sodium chloride solution (0.9%) and identified following taxonomic keys. A total of 160 birds (83.77%) were infected with more than one helminth, with predominance of nematodes (73.30%), cestodes (45.50%), and a lower percentage of trematodes (3.66 %). A total of 5562 helminths were classified into 12 distinct species. Comparing the groups of helminths recovered, a predominance of the nematode group was observed, which obtained the highest mean among the samples (25.92 helminths / birds). The species with the highest occurrence (62.30%) and recovery of helminths by bird was the nematode *Heterakis gallinarum* (22.75 helminths / bird). Among the cestodes, the most prominent species was *Raillietina echinobothrida* (37.30%), with a mean of 2.24 helminths recovered per bird. Although no difference was observed between the mean number of trematode species recovered per bird, *Postharmostomum commutatum* obtained a higher percentage of occurrence (3.14%). The high occurrence of gastrointestinal helminthes (83.77%) associated with the presence of mixed infections can be attributed to environmental conditions and management of the breeding system. As with reports from other countries, increased occurrence of nematode and cestode infections in poultry breeding systems in the open air was verified in this study. Despite

the scarcity of data on domestic poultry helminth infections in the Brazilian literature, the high occurrence and parasitic load detected in this study are consistent with results found by other authors and parasitological surveys should be specific for each region. It is the first study to estimate the gastrointestinal helminth fauna of *G. domesticus* created in an extensive system in the municipality of Vicoso, Minas Gerais, and it is expected that these results will contribute to epidemiological surveys of domestic bird parasites in the region. The survey of the main species of helminths of *G. domesticus* allied to strategic management may favor prophylactic and control measures of these parasites.

**Key words:** poultry, extensive breeding, gastrointestinal helminthes

## 1. INTRODUÇÃO

Sistemas de produção extensivos possuem finalidade de promover comportamentos naturais e aumentar o bem-estar animal, todavia, são caracterizados por altos níveis de infecções helmínticas. As helmintoses das aves domésticas na maioria das vezes são assintomáticas, todavia, podem ocasionar deficiências nutricionais, predispor à infecções secundárias, interferir no desenvolvimento imunológico pós-vacinal das aves e levar ao óbito (Araújo et al., 2015; Berchieri-Júnior et al., 2009; Cardozo e Yamamura, 2004; Fernandes et al., 2015; Gomes et al., 2009; McDougald, 2013; Taylor et al., 2016; Vieira et al., 2015; Silva et al., 2018).

Variações na ocorrência de helmintos gastrintestinais em *G. domesticus* se devem em grande parte aos fatores geográficos e condições climáticas regionais que influenciam o ciclo biológico dos helmintos (Gomes et al., 2009; Silva et al., 2018; Vieira et al., 2015).

Os helmintos gastrintestinais mais frequentemente relatados parasitando aves domésticas pertencem ao filo Nematoda (Taylor et al., 2016). Constituem o grupo mais importante de helmintos, tanto em termos de número de espécies como de patogenia (Ruff, 1999; Thapa et al., 2015).

No filo Platyhelminthes encontram-se as classes Cestoda e Trematoda, com membros que realizam ciclo indireto, necessitando de um ou mais hospedeiros intermediários, com graus variados de patogenicidade (Mcdougald, 2013; Taylor et al., 2016). No Brasil, mais de 200 espécies de trematódeos já foram relatadas em aves, sendo dezenas destas relatadas em aves domésticas (Fernandes et al., 2015). Trematódeos digenéticos adultos como os membros da família Echinostomatidae e *Postharmostomum commutatum*, embora tenham sido descritos anteriormente no Brasil, são pouco relatados e possuem aspectos como etiopatogenia e potencial zoonótico ainda não completamente elucidados (Fernandes et al., 2015; Pinto e Melo, 2013; Silva et al., 2016; Vieira et al., 2015).

Estudos de ocorrência e intensidade de infecção das helmintoses gastrintestinais de *G. domesticus* são escassos na literatura brasileira e devem ser específicos para cada região do país (Gomes et al., 2009; Silva et al., 2016, 2018; Vieira et al., 2015). Devida a elevada ocorrência e importância econômica, levantamentos parasitológicos em diferentes locais e períodos são fundamentais para o inquérito epidemiológico de parasitos e até o momento, nenhum estudo havia sido realizado para estimar as espécies

de helmintos mais frequentes em *G. domesticus* criados em sistema extensivo no município de Viçosa, Minas Gerais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de dezembro de 2017 a setembro de 2018, o trato digestivo de 191 aves criadas em sistema extensivo foram abatidas por produtores município de Viçosa, Minas Gerais, e o material doado ao trabalho. O município situa-se na região da Zona da Mata, entre latitude sul 20°45'14" e longitude oeste 42°52'55", compreende uma área de aproximadamente 300km<sup>2</sup> com pequenas e médias propriedades rurais, em sua maioria composta por agricultores familiares.

Os intestinos delgado e grosso foram examinados quanto à presença e intensidade de infecções helmínticas utilizando métodos parasitológicos padrões (Amato e Amato, 2009; Permin e Hansen, 1998). O intestino delgado foi dividido em 3 partes, utilizando o divertículo de Meckel (vestígio do saco vitelínico) como referência para assinalar o terço intermediário, uma vez que as divisões anatômicas (duodeno, jejuno e íleo) não são bem demarcadas como nos mamíferos (Berchieri-Júnior et al., 2017). Cecos e reto foram abertos por último.

Cada segmento do trato gastrintestinal examinado foi individualmente aberto com tesoura em secção longitudinal, e lavado com água de torneira sobre uma peneira com 100µm de abertura, para que possibilitasse remover helmintos que ficam aderidos à mucosa. Os helmintos encontrados foram separados em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo solução de cloreto de sódio a 0,9% conforme suas características morfológicas e contabilizados por cada animal. A identificação dos helmintos adultos foi realizada através de visualização em microscópio estereoscópico e ótico e baseada nas descrições morfológicas disponíveis na literatura (Khalil et al., 1994; Permin e Hansen, 1998; Schmidt, 1986; Taylor et al., 2016; Travassos et al., 1969; Vicente et al., 1995; Yamaguti, 1961, 1975).

As ocorrências individuais e por grupo de helmintos observadas durante o estudo foram determinadas pelo cálculo percentual da população infectada. As médias de helmintos recuperados de cada espécie foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que de 191 tratos digestivos avaliados, a maioria deles (83,77%) eram positivos para pelo menos uma espécie de helminto. Um total de 5562 helmintos distribuídos entre as classes Cestoda (45,50%), Trematoda (3,66%) e filo Nematoda (73,30%) foram identificados e classificados em 9 gêneros. O percentual de ocorrência de helmintos (Nematoda, Cestoda, Trematoda) e a média de helmintos recuperados por ave estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Ocorrência percentual, média e desvio-padrão (DP) de helmintos recuperados em análise *post mortem* do conteúdo intestinal de 191 aves abatidas no município de Viçosa, Minas Gerais, no período de dezembro de 2017 a setembro de 2018.

<b>Helminto</b>	<b>Ocorrência (%)</b>	<b>Helmintos recuperados/ave</b>	<b>DP</b>
<i>Ascaridia galli</i>	29,84	2,77 a	9,41
<i>Heterakis gallinarum</i>	62,30	22,75 b	44,37
<i>Capillaria</i> spp.	12,04	0,40 c	1,91
<b>Nematódeos</b>	<b>73,30</b>	<b>25,92 A</b>	<b>46,38</b>
<i>Raillietina tetragona</i>	12,57	0,37 d	1,37
<i>Raillietina echinobothrida</i>	37,70	2,24 e	5,45
<i>Raillietina cesticillus</i>	4,19	0,17 fd	1,02
<i>Choanotaenia infundibulum</i>	3,66	0,08 fd	0,62
<i>Hymenolepis cantaniana</i>	2,62	0,06 f	0,41
<i>Hymenolepis carioca</i>	1,05	0,01 f	0,10
<i>Davainea proglottina</i>	0,52	0,02 f	0,21
<b>Cestódeos</b>	<b>45,50</b>	<b>2,94 B</b>	<b>6,53</b>
<i>Postharmostomum commutatum</i>	3,14	0,25 g	1,85
<i>Echinostoma</i> sp.	0,52	0,02 g	0,21
<b>Trematódeos</b>	<b>3,66</b>	<b>0,26 C</b>	<b>1,86</b>
<b>TOTAL</b>	<b>83,77</b>	<b>29,12</b>	<b>46,82</b>

Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas (A, B, C) diferentes indicam diferenças entre as médias dos grupos analisados e letras minúsculas distintas (a, b, c, d, e, f, g) referem-se à diferença das médias observadas dentro de cada grupo.

Comparando grupos de helmintos recuperados neste estudo, foi possível observar distribuição distinta, sendo que o grupo dos nematódeos obteve a maior média e desvio-padrão entre as amostras (25,92).

*Heterakis gallinarum* representou 62,30% do total de nematódeos e obteve maior média (22,75) em relação ao total de helmintos recuperados das aves, correspondendo a 4345 exemplares encontrados nas análises.

Dentro da classe Cestoda foram identificadas 7 espécies, sendo *Raillietina echinobothrida* predominante sobre as demais espécies do grupo (37,30% e 2,24 helmintos recuperados/ave).

Do total de 50 trematódeos coletados nos cecos dos animais (0,26 helmintos recuperados/ave), foram identificadas as espécies *P. commutatum* (3,14%) e *Echinostoma* sp. (0,52%).

#### 4. DISCUSSÃO

A elevada ocorrência de helmintoses gastrintestinais (83,77%) associada à presença de infecções mistas observadas neste estudo podem ser atribuídas às condições ambientais e manejo que favorecem o contato com estágios infectantes de parasitos e hospedeiros intermediários. Recentemente, quando avaliados diferentes sistemas de criação avícola no sudeste do Brasil, 15 espécies de helmintos (6 cestódeos, 7 nematódeos e 2 trematódeos) foram encontradas parasitando aves domésticas (Silva et al., 2018).

No presente estudo foram identificadas 12 espécies de helmintos recuperadas de *G. domesticus* na análise *post mortem*, distribuídas entre as classes Cestoda, Trematoda e filo Nematoda, sendo esses resultados próximos aos encontrados em estudo conduzido em diferentes regiões do estado de São Paulo, em que identificaram 14 espécies de helmintos (Silva et al., 2016).

Os resultados obtidos neste estudo, como o percentual de ocorrência (83,77%) e média de helmintos recuperados ( $29,12 \pm 46,82$ ) em aves domésticas está de acordo com resultados de outro estudo conduzido no estado do Paraná, no qual avaliaram 262 aves e identificaram 225 (85,9%) positivas para pelo menos um espécime de helminto, sendo *H. gallinarum* correspondente a 71,4% do percentual de animais infectados e 21,1 exemplares recuperados nos cecos das aves (Vieira et al., 2015). Os valores próximos comparados aos deste estudo, sugerem que a elevada ocorrência de *H. gallinarum* está intimamente relacionada ao seu ciclo biológico direto e a exposição contínua dos animais aos ovos distribuídos no ambiente.

A variação climática do município de Viçosa associada ao sistema de criação extensivo, influenciam favoravelmente na manutenção de parasitos de ciclo biológico

direto, como também a distribuição ubíqua de hospedeiros intermediários de cestódeos e trematódeos (Permin et al., 1999; Ruff, 1999; Silva et al., 2018; Thapa et al., 2015; Vieira et al., 2015). De fato, isso contribui para dificuldade de controle eficaz de helmintos parasitos gastrintestinais e, conseqüentemente, há aumento das estatísticas de mortalidade no plantel.

Quando avaliadas as principais espécies de helmintos presentes em criações avícolas intensivas e extensivas de 17 municípios do estado de São Paulo, foram encontradas predominantemente *C. infundibulum* e *R. cesticillus* (88 e 65%, respectivamente) no grupo dos cestódeos (Silva et al., 2016). Em contrapartida, neste estudo o cestódeo de maior ocorrência foi *R. echinobothrida* (37,70%). No entanto, dados discrepantes podem ser observados devido à fragmentação de proglotes ou perda dos escólex na mucosa dos intestinos, acarretando resultados imprecisos nas análises de diferentes estudos.

Relatos em outros países também ressaltam elevada ocorrência de infecções por nematódeos e cestódeos em sistemas de criação de aves ao ar livre. *Heterakis gallinarum* foi o helminto mais frequentemente encontrado em estudos realizados na Dinamarca (Permin et al., 1999), Alemanha (Kaufmann et al., 2011) e Estados Unidos (Yazwinski et al., 2013). Diferentemente de estudos conduzidos na Argélia (Yousfi et al., 2013), Bangladesh (Ferdushy et al., 2016) e Nigéria (Imam et al., 2017), no presente estudo os cestódeos obtiveram o percentual de 45,50% do total de helmintos encontrados nas aves. Em razão das elevadas temperaturas no continente africano que podem favorecer a manutenção de artrópodes hospedeiros intermediários de helmintos, assim como o ressecamento dos ovos de nematódeos ascaridídeos, pesquisadores observaram percentual de ocorrência mais marcante de *Raillietina* spp. em detrimento aos nematódeos. O diagnóstico genérico de *Raillietina* pode ser conturbado, uma vez que coexistem outras espécies de cestódeos nos intestinos e organização estrutural do helminto permite sua fragmentação quando manipulado.

Os trematódeos *Postharmostomum commutatum* e *Echinostoma* sp. obtiveram distribuição homogênea entre si, ainda que demonstrassem menor percentual de ocorrência (3,66%) nas aves comparativamente aos grupos de nematódeos (73,30%) e cestódeos (45,50%). Embora no presente trabalho não tenha sido observada diferença entre a média de espécies de trematódeos recuperadas por ave, *P. commutatum* obteve maior percentual de ocorrência (3,14%), sendo corroborado por resultado próximo ao observado previamente (2,7%) em um estudo conduzido no estado do Paraná (Vieira et

al., 2015). O diagnóstico e identificação precisa desses parasitos requer estudos mais aprofundados do que apenas a caracterização morfológica de espécimes adultos (Pinto e Melo, 2013), devido aos seus ciclos biológicos complexos e taxonomias controversas (Travassos et al., 1969).

A competição por recursos nutricionais pelas diferentes espécies de helmintos e a resposta imune do hospedeiro podem influenciar na diversidade da população de parasitas. Todavia, os mecanismos responsáveis pelo controle da densidade de parasitos não são totalmente elucidados (Thapa et al., 2018).

O diagnóstico correto associado à observação dos fatores de manejo podem auxiliar no controle de parasitos gastrintestinais de aves em sistemas extensivos (Thapa et al., 2015). O registro de elevada ocorrência e infecções mistas por helmintos observadas neste estudo sugerem a adoção de medidas profiláticas estratégicas que considerem a biologia do parasito e as condições geográficas a fim de reduzir o risco dessas enfermidades a longo prazo.

O registro de elevada ocorrência e múltiplas infecções por helmintos observadas neste estudo sugerem a adoção de medidas profiláticas que possibilitem reduzir o risco dessas enfermidades.

## 5. REFERÊNCIAS

AMATO, J.F.R.; AMATO, S.B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: VON MATTER, S. et al. **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro-RJ. Technical Books, 2009.

ARAÚJO, J.L.; OLINDA, R.G.; FRADE, M.T.S.; MAIA, L.A.; DANTAS, A.F.M. Histomoniasis outbreak in free-range chickens in semiarid Paraíba, Brazil. **Semina: Ciênc Agrárias**, 36 (1): 307-312, 2015.

BERCHIERI-JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**, 2 ed., FACTA, Campinas-SP, 2009.

CARDOZO, S.P.; YAMAMURA, M.H. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina: Ciênc. Agrárias**, 25 (1): 63-74, 2004.

COSTA, H.M.A.; LEITE, A.C.R.; GUIMARÃES, M.P.; LIMA, W.S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, 38(4):465-579, 1986.

FERDUSHY, T.; HASAN, M.T.; KADIR, A.K.M.G. Cross sectional epidemiological investigation on the prevalence of gastrointestinal helminths in free range chickens in Narsingdi district, Bangladesh. **J Parasit Dis**, 40(3):818-22, 2016.

FERNANDES, B.M.M.; JUSTO, M.C.N.; CÁRDENAS, M.Q.; COHEN, S.C. **South American Trematodes Parasites of Birds and Mammals**, Oficina de Livros, Rio de Janeiro-RJ, 2015.

GOMES, F.F.; MACHADO, H.H.S.; LEMOS, L.S.; ALMEIDA, L.G.; DAHER, R.F. Principais parasitos intestinais diagnosticados em galinhas domésticas criadas em regime extensivo na municipalidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Ci. Anim. Bras.**, 10 (3): 818-822, 2009.

KAUFMANN, F.; DAŞ, G.; SOHNREY, B.; GAULY, M. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. **Livest. Sci.**, 141: 182–187, 2011.

KHALIL, L.F.; JONES, A.; BRAY, R.A. **Keys to the cestode parasites of vertebrates.** CAB International, United Kingdom, 1994.

McDOUGALD, L.R. **Internal Parasites.** In: SWAYNE, D.E. Disease of Poultry. 13 ed., John Wiley & Sons, 2013.

PERMIN, A.; BISGAARD, M.; FRANDBSEN, F.; PEARMAN, M.; KOLD, J.; NANSEN, P. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. **Br. Poul. Sci.**, 40: 439–443, 1999.

PERMIN, A.; HANSEN, J.W. **Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites**, n.4, FAO Animal Health Manual, Roma, 1998.

PINTO, H.A.; MELO, A.L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. **Rev Patol Trop**, 42 (4): 369-386. 2013.

RUFF, M.D. Important parasites in poultry production systems. **Vet. Parasitol.**, 84: 337-347. 1999.

SCHMIDT, D. **CRC Handbook of tapeworm identification.** CRC Press, Florida, 1986.

SILVA, G.S.; ROMERA, D.M.; CONHALATO, G.S.; SOARES, V.E.; MEIRELES, M.V. Helminth infections in chickens (*Gallus domesticus*) raised in different production systems in Brazil. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**, 12: 55-60, 2018.

SILVA, G.S.; ROMERA, D.M.; FONSECA, L.E.C.; MEIRELES, M.V. Helminthic parasites of chickens (*Gallus domesticus*) in different regions of São Paulo state, Brazil. **Rev. Bras. Ciênc. Avic.**, 18 (1): 163-169, 2016.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**, 4 ed., Wiley Blackwell, UK, 2016.

THAPA, S.; HINRICHSEN, L.K.; BRENNINKMEYER, C.; GUNNARSSON, S.; HEERKENS, J.L.T.; VERWER, C.; NIEBUHR, K.; WILLETT, A.; GRILLI, G.; THAMSBORG, S.M.; SØRENSEN, J.T.; MEJER, H. Prevalence and magnitude of helminth infections in organic laying hens (*Gallus gallus domesticus*) across Europe. **Vet. Parasitol.**, 214: 118–124, 2015.

TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA DE FREITAS, J.F.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 67: 1-886, 1969.

VICENTE, J.J.; RODRIGUES, H.O.; GOMES, D.C.; PINTO, R.M. Nematoides do Brasil, parte IV: Nematoides de aves. **Rev. Bras. Zool.**, 12 (1): 1-273, 1995.

VIEIRA, F.E.G.; YAMAMURA, M.H.; FREIRE, R.L.; HEADLEY, S.A. The effects of managerial systems on helminth infections in free-range chickens from northern Paraná, Brazil. **Semina: Ciênc. Agrárias**, 36 (6): 4311-4322, 2015.

YAMAGUTI, S. **A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates with especial reference to the morphology of their larval forms**. Keygaku Publishing Co., Japan, 1975.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**, v.III, The Nematode Parasites of Vertebrates, part I; II, Interscience, New York, 1961.

YAZWINSKI, T.; TUCKER, C.; WRAY, E.; JONES, L.; JOHNSON, Z.; STEINLAGE, S.; BRIDGES, J. A survey on the incidence and magnitude of intestinal helminthiasis in broiler breeders originating from the southeastern United States. **J. Appl. Poult. Res.**, 22: 942-947, 2013.

YOUSFI, F.; SENOUCI, K.; MEDJOUAL, I.; DJELLIL, H.; SLIMANE, T.H. Gastrointestinal helminths in the local chicken *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) in traditional breeding of North-Western Algeria. **Biodivers. J.**, 4 (1): 229-234, 2013.

## CAPÍTULO 2

---

***Pochonia chlamydosporia* no controle biológico de nematódeos parasitos  
gastrintestinais de galinhas criadas em sistema extensivo no Brasil**

---

**Marisa Caixeta Valadão<sup>1</sup>, Lorendane Millena de Carvalho<sup>1</sup>, Ítalo Stoupa Vieira<sup>1</sup>,  
Paulo Henrique Neves<sup>1</sup>, Vinícius Monteiro Ferreira<sup>1</sup>, Artur Kanadani Campos<sup>1</sup>,  
Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Departamento de Veterinária,  
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## RESUMO

A demanda por produtos avícolas que aliem sustentabilidade e bem-estar animal tem favorecido as criações extensivas, todavia, tais criações expõem os animais a helmintos, causando mortes de aves e prejuízos aos produtores. A redução da contaminação ambiental com formas infectantes de helmintos é importante no controle dos parasitos gastrintestinais em aves e o uso de controladores biológicos pode contribuir nesse aspecto. Este trabalho avaliou a atividade do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de nematódeos gastrintestinais de *Gallus domesticus*. A resistência e viabilidade de germinação do fungo após passagem pelo trato gastrintestinal de aves criadas em sistema extensivo foram avaliadas. Os animais foram separados em dois grupos (controle e tratado). O percentual de interação entre o isolado fúngico mantido em laboratório e recuperado após a passagem pelo trato gastrintestinal com ovos de *Ascaridia galli* e *Heterakis gallinarum* foi comparado. Leituras em microscópio de luz foram realizadas a cada 24 horas, por um período total de 144h. Nos tempos de interação 24 e 72h, *P. chlamydosporia* mantido em laboratório mostrou percentual de interação de 35,0% e 81,1%, respectivamente, sobre ovos de *A. galli*. Em relação à interação com ovos de *H. gallinarum*, o fungo exibiu 25,5% de interação em 24h e 83,8% em 72h. Após passagem pelo trato gastrintestinal das aves, o isolado apresentou no tempo de 24h, 6,4% e em 72h de 34,3% de interação com ovos de *A. galli*. Com ovos de *H. gallinarum*, o percentual foi 2,0% e 18,8%, respectivamente, em 24h e 72h de interação. Os maiores percentuais de interação foram observados no tempo de 144h de interação entre fungo-ovos em ambos os helmintos testados. Posteriormente, o processo de interação entre o fungo e os ovos de *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura. Apesar da extensa colonização da superfície dos ovos dos nematódeos, nenhum sítio de penetração e destruição dos ovos por estruturas fúngicas foi observado. *P. chlamydosporia* demonstrou resistência à passagem pelo trato gastrintestinal de aves e potencial ovicida sobre ovos de nematódeos de *G. domesticus*, sugerindo a possibilidade de usá-lo como controlador biológico.

**Palavras-chave:** *Pochonia chlamydosporia*, controle biológico, helmintose, *Gallus domesticus*

## ABSTRACT

The demand for poultry products that combine sustainability and animal welfare has favored extensive breeding, however, such creations expose animals to helminths, causing bird deaths and harm to producers. The reduction of environmental contamination with infective forms of helminths is important in the control of gastrointestinal parasites in birds and the use of biological controllers may contribute to this aspect. This work evaluated the activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on eggs of gastrointestinal nematodes of *Gallus domesticus*. The resistance and viability of fungus germination after passage through the gastrointestinal tract of poultry reared in an extensive system were evaluated. The animals were separated into two groups (control and treated). The percentage of interaction between the fungal isolate kept in the laboratory and recovered after passage through the gastrointestinal tract with eggs of *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinarum* was compared. Light microscope readings were performed every 24 hours for a total period of 144h. At interaction times 24 and 72h, *P. chlamydosporia* kept in the laboratory showed percentage of interaction of 35.0% and 81.1%, respectively, on *A. galli* eggs. Concerning the interaction with eggs of *H. gallinarum*, the fungus exhibited 25.5% interaction in 24h and 83.8% in 72h. After passage through the gastrointestinal tract of the birds, the isolate presented in a time of 24h, 6.4% and in 72h of 34.3% of interaction with *A. galli* eggs. With eggs of *H. gallinarum*, the percentage was 2.0% and 18.8%, respectively, in 24h and 72h of interaction. The highest percentages of interaction were observed in the 144h time of interaction between fungus-eggs in both helminths tested. Subsequently, the interaction process between the fungus and eggs of *A. galli*, *H. gallinarum* and *Tetrameres* sp. was characterized by scanning electron microscopy. Despite extensive colonization of nematode egg surface, no site of penetration and destruction of eggs by fungal structures was observed. *P. chlamydosporia* demonstrated resistance to passage through the gastrointestinal tract of birds and ovicidal potential on nematode eggs of *G. domesticus*, suggesting the possibility of using it as a biological controller.

**Key words:** *Pochonia chlamydosporia*, biological control, helminthosis, *Gallus domesticus*

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2018, o Brasil produziu mais de 13 milhões de toneladas de carne de frango e lidera o ranking mundial dos países exportadores conforme dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). Apesar de a avicultura intensiva ter consolidado o país como maior exportador mundial de produtos avícolas, a preocupação com bem-estar animal aliada à demanda do consumidor por produtos livres de resíduos químicos, têm favorecido as criações de aves em sistemas ao ar livre, as quais geram produtos diferenciados no mercado e desenvolvimento rural sustentável, sobretudo para pequenos e médios produtores rurais (Albino et al., 2005; AVAL, 2019).

Contudo, devido ao maior contato das aves com o solo e ao seu hábito alimentar, esses sistemas de criação possibilitam uma maior ocorrência de helmintoses gastrintestinais nas aves (Cardozo e Yamamura, 2004; Kaufmann et al., 2011; Vieira et al., 2015; Sharma et al., Silva et al, 2018). Em função dos efeitos deletérios que as helmintoses podem causar na saúde e desempenho do plantel, práticas de monitoramento e prevenção devem ser adotadas a fim de se evitarem prejuízos financeiros (Cardozo e Yamamura, 2004; Berchieri-Júnior et al., 2009; Thapa et al., 2015).

O controle das helmintoses é realizado predominantemente com fármacos anti-helmínticos e, devido ao uso incorreto e indiscriminado desses produtos, observa-se a seleção de cepas cada vez mais resistentes aos princípios ativos, além da geração de resíduos nos produtos avícolas e contaminação do ambiente (Silva et al., 2017). Considerados antagonistas naturais de helmintos, fungos com atividade ovicida tem sido utilizados com êxito no controle de helmintos gastrintestinais de animais domésticos, reduzindo o uso de fármacos anti-helmínticos.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare e Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium*) parasita ovos de helmintos através de estruturas especializadas denominadas apressórios, que permitem a colonização da superfície do ovo e penetração por ação mecânica e enzimática (Lopez-Llorca et al., 2002; Dallemole-Giaretta, 2008). Diversos estudos abordaram a eficácia de *P. chlamydosporia* no controle de helmintos de animais domésticos como *Oxyuris equi* (Braga et al., 2010), *Ascaris suum* (Ferreira et al., 2011), *Fasciola hepatica* (Dias et al., 2012) e *Toxocara canis* (Araújo et al., 2013). Em aves a sua eficácia *in vitro* foi avaliada por Thapa et al. (2015) e Braga et al. (2012). Contudo, não há relatos que comprovem essa eficácia após a administração desse fungo em aves em sistemas de produção.

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o percentual de interação de *P. chlamydosporia* e ovos de *Ascaridia galli* e *Heterakis gallinarum* antes e após a passagem pelo trato gastrintestinal de galinhas e caracterizar o processo de colonização dos ovos de *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. pelo fungo por meio da microscopia eletrônica de varredura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e oito proventrículos e parte do trato gastrintestinal (duodeno até abertura anal) de 191 aves domésticas criadas em sistema extensivo e abatidas por pequenos produtores da região de Viçosa foram avaliados entre dezembro de 2017 e setembro de 2018. O município situa-se entre latitude sul 20°45'14" e longitude oeste 42°52'55", na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil.

Para obter ovos de helmintos, as vísceras foram dissecadas com lâmina de bisturi e tesoura para coleta de helmintos de acordo com trabalho de Amato e Amato (2009). As fêmeas dos nematódeos encontradas foram identificadas utilizando as descrições morfológicas fornecidas por Yamaguti (1961), Vicente et al. (1995) e Permin e Hansen (1998).

Espécimes dos nematódeos *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum* e *Tetrameres* sp. obtidos foram lavados com água destilada e macerados, separadamente, utilizando gral e pistilo de porcelana. As soluções obtidas foram filtradas através de peneira granulométrica de 100µm para separar os ovos dos fragmentos de helmintos adultos. Posteriormente, o material obtido foi lavado por 3 vezes em água destilada, centrifugando a cada vez, 1.000 rpm por 5 minutos para obtenção de soluções aquosas distintas contendo ovos de *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. A quantificação de 200 ovos de cada espécie foi feita por média aritmética a partir de 5 alíquotas de 50µl da solução obtida após coleta e extrapolada para o volume final.

O fungo *P. chlamydosporia* (isolado VC4) utilizado é proveniente do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil. Esse isolado é mantido a 4°C, ao abrigo de luz, em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2%.

Com intuito de avaliar o crescimento de *P. chlamydosporia* em substrato de milho triturado para que pudesse ser fornecido às aves, foram seguidos protocolos modificados estabelecidos por Dallemole-Giaretta et al. (2011) e Maciel et al. (2009). Em 11

embalagens de polipropileno autoclaváveis (45cm x 38cm) foram inseridos 150g do substrato de milho triturado e 60ml de água destilada, esterilizados a 120°C por 30 minutos.

Posteriormente, foram transferidos 12 discos de cultura de 5mm de diâmetro de *P. chlamydosporia* para as 11 embalagens e incubadas a 25°C no escuro por 15 dias. Após esse período, para verificar o crescimento de *P. chlamydosporia* no substrato de milho, 6 alíquotas de 1g do conteúdo de cada embalagem foram retiradas, transferidas para Erlenmeyer contendo 10 mL de água destilada, uma gota do dispersante Tween 80 e agitadas por 2 minutos com agitador magnético. Por fim, foi realizada filtragem em gaze 4 malhas e a concentração média de clamidósporos foi estimada com um hemocítômetro preenchido com 10µl da solução obtida. A média foi estimada calculando o número de esporos em 4 compartimentos do hemocítômetro e multiplicado por 10<sup>4</sup>, segundo metodologia descrita por Alfenas et al. (2016).

Para testar a capacidade de germinação do fungo helmintófago *P. chlamydosporia* após passagem pelo trato gastrintestinal de *G. domesticus*, foram utilizadas 22 galinhas, com peso médio de 2,3 kg, mantidas em sistema extensivo no aviário do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil.

Os animais foram divididos em dois grupos de 11 animais cada: controle (recebeu milho triturado sem fungo) e tratado (recebeu milho triturado com o fungo *P. chlamydosporia* previamente crescido). Cada ave foi pesada e alojada individualmente em gaiola de arame galvanizado (68cm x 30cm x 30cm) lotada no interior de um galpão de alvenaria coberto com telhas de barro, por 9 dias, sendo 7 dias para aclimação dos animais, conforme recomendado pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP) (Yazwinski et al., 2003).

Com auxílio de um termo higrômetro, foram verificadas temperatura média (° C) e umidade relativa do ar (%) no interior do galpão a cada 24 horas. O ambiente apresentou durante o período experimental, temperatura média (26,0°C) e umidade relativa do ar (61,2%), descartando a indução de estresse térmico nos animais. Ao final desse ensaio, as aves foram novamente pesadas e realocadas aos piquetes de origem que possuem 168m<sup>2</sup>, comportando um total de 90 aves e são forrados com gramínea estolonífera (*Brachiaria humidicola*), uma vez que estas possuem alto teor de proteína, boa digestibilidade e grande taxa de redobra. Além disso, existe um abrigo em alvenaria e ninhos para poedeiras, para proteção dos animais de ventos fortes e chuva.

Diariamente, cada ave recebia 150g de milho triturado autoclavado sem a presença do fungo, sendo que no 8º dia, o grupo tratado recebeu, em dose única, o substrato de milho contendo *P. chlamydosporia*. As bandejas sob as gaiolas foram forradas com sacos plásticos e amostras fecais recolhidas dos grupos controle e tratado às 0, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 horas após o fornecimento do milho triturado contendo *P. chlamydosporia* para o grupo tratado. As amostras de cada grupo foram homogeneizadas e 1g de fezes foi adicionada em placas de Petri (5 placas por horário/grupo) de 5cm de diâmetro, contendo 10ml de ágar-água 2% (AA 2%), incubadas a 25°C no escuro, por 30 dias. As placas foram examinadas diariamente, para identificar estruturas compatíveis com *P. chlamydosporia* conforme descrições fornecidas por Zare et al. (2001).

Após a visualização de estruturas de *P. chlamydosporia* nas placas em que as fezes dos animais do grupo tratado foram depositadas, foram feitos repiques para placas de Petri de 5cm de diâmetro (5 placas por horário), contendo 10ml de AA 2%. Também foram feitos repiques do isolado de *P. chlamydosporia* mantido em laboratório para outras placas (5 placas por horário), para que as atividades ovíparas do isolado antes e após passagem pelo trato gastrointestinal de galinhas pudessem ser comparados entre si na presença de os ovos de *A. galli* e *H. gallinarum*. As placas foram incubadas por 10 dias no escuro e após este período, 200 ovos de cada nematódeo foram transferidos para cada placa.

A cada 24 horas, por um período total de 144 h, 100 ovos por placa foram observados aleatoriamente através de microscópio de luz (objetiva de 10x) e avaliados quanto a integridade da casca e se havia desenvolvimento embrionário após a colonização por *P. chlamydosporia*. Foram mantidas condições idênticas para todos os grupos.

O percentual de ovos de *A. galli* e *H. gallinarum* colonizados pelo isolado mantido em laboratório e pelo recuperado após passagem pelo trato gastrointestinal das aves foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de interação} = \frac{\text{Número de ovos com interação fúngica}}{\text{Número total de ovos observados}} \times 100$$

Na análise comparativa do percentual de interação entre o isolado fúngico antes e após passagem pelo trato gastrointestinal das aves e ovos dos nematódeos, foram utilizados o teste “t” de Student, ANOVA e teste “f” de Tukey, com significância de 5%.

O processo de colonização de *P. chlamydosporia* sobre os ovos de nematódeos *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. foi observada através de microscopia eletrônica de varredura utilizando técnica proposta por Nordbring-Hertz (1983), e modificações por Maciel et al. (2009) e Oliveira et al. (2018). Para isso, discos de 6cm de diâmetro de membrana de diálise com porosidade para moléculas até 12.0kD, foram cortados, lavados 5 vezes em água destilada e esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Na capela de fluxo laminar, os discos adicionados à superfície interna de 15 placas de Petri de 6 cm, contendo AA 2% e receberam suspensão aquosa contendo aproximadamente  $10^4$  clamidósporos de *P. chlamydosporia*. As placas foram seladas e incubadas a 26°C, em câmara de germinação no escuro por 20 dias para germinação de clamidósporos e colonização da membrana e ao final, foi adicionada alíquota contendo 200 ovos de cada gênero dos nematódeos supracitados. Todas as placas foram incubadas novamente durante 8 dias, nas mesmas condições.

Após o período de 8 dias de incubação, retalhos de membrana de diálise de 0,5cm<sup>2</sup>, das placas com fungo e ovos de nematódeos foram cortados com uma lâmina de bisturi, coletados com pinça de ponta fina e fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,05 M de tampão fosfato, pH 7,4 por 24h, lavados 3 vezes no mesmo tampão e desidratados através de passagem do material em série de etanol (30, 50, 60, 70, 95 e 100%). O material foi seco em secador de ponto crítico utilizando dióxido de carbono, recoberto com ouro em metalizador e elétron micrografado em microscópio eletrônico de varredura a 10-15kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálises, localizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil.

### 3. RESULTADOS

No grupo tratado cada ave ingeriu, em dose única, 29g de substrato de milho contendo  $3,3 \times 10^6$  clamidósporos. Estruturas fúngicas como conídios, clamidósporos e hifas compatíveis com *P. chlamydosporia* foram identificadas nas placas de Petri contendo fezes de aves do grupo tratado com fungo a partir do intervalo de 6 horas após a administração, confirmando a resistência e capacidade de germinação do fungo após passagem pelo trato gastrintestinal de *G. domesticus*. Não foram observadas estruturas de *P. chlamydosporia* nas placas de Petri com as fezes das aves do grupo controle, em nenhum momento.

O fungo *P. chlamydosporia* mantido em laboratório e após passagem pelo trato gastrointestinal das aves apresentou atividade ovicida em ovos de *A. galli* e *H. gallinarum*. Foi observado que o percentual de interação dos ovos com o fungo *P. chlamydosporia* aumentou com o avanço do tempo de incubação. Os percentuais de interação do isolado de *P. chlamydosporia* antes e após passagem pelo trato gastrointestinal das aves a partir das fezes das aves com os ovos de *A. galli* e *H. gallinarum* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2 – Percentual de interação (%) e erro-padrão das médias (EPM) entre *Pochoxia chlamydosporia* mantido em laboratório (VC4) e após passagem pelo trato gastrointestinal das aves (Recuperado) e ovos dos nematódeos *Ascaridia galli* e *Heterakis gallinarum*, observado nos intervalos de interação de 24 a 144 horas.

Leitura (h)	<i>Ascaridia galli</i>		<i>Heterakis gallinarum</i>	
	VC4 (%) (EPM)	Recuperado (%) (EPM)	VC4 (%) (EPM)	Recuperado (%) (EPM)
24	35,0 <sup>a A</sup> (3,8)	6,4 <sup>b A</sup> (2,2)	25,5 <sup>a E</sup> (4,3)	2,0 <sup>b E</sup> (1,6)
48	64,5 <sup>a B</sup> (3,8)	18,3 <sup>b AC</sup> (5,4)	69,1 <sup>a F</sup> (2,1)	10,8 <sup>b EF</sup> (4,5)
72	81,1 <sup>a C</sup> (3,6)	34,3 <sup>b ACD</sup> (9,0)	83,8 <sup>a G</sup> (3,8)	18,8 <sup>b EF</sup> (8,9)
96	82,1 <sup>a CD</sup> (2,1)	40,5 <sup>b BC</sup> (8,8)	85,8 <sup>a G</sup> (2,4)	32,8 <sup>b EF</sup> (11,1)
120	90,7 <sup>a CD</sup> (2,8)	44,5 <sup>b BC</sup> (9,0)	91,9 <sup>a G</sup> (2,4)	39,5 <sup>b EF</sup> (9,8)
144	94,8 <sup>a D</sup> (0,9)	59,9 <sup>b BD</sup> (6,1)	95,0 <sup>a G</sup> (2,6)	43,2 <sup>b F</sup> (12,2)

Teste t de Student: letras minúsculas distintas entre linhas, indicam diferença entre os dados de interação no mesmo tempo de leitura e mesma espécie de helminto ( $p < 0,05$ ).

Teste f de Tukey: letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças entre os dados de interação de cada um dos isolados, em diferentes tempos de leitura ( $p < 0,05$ ).

Quando comparado com *P. chlamydosporia* após a passagem pelo trato gastrintestinal das aves, *P. chlamydosporia* mantido em laboratório e testado in vitro antes dessa passagem apresentou maiores percentuais de interação em todos os horários avaliados. Nos intervalos de 24, 48 e 72h, verificou-se maiores percentuais de interação (25,5; 69,1 e 83,8%, respectivamente) entre o isolado mantido em laboratório e os ovos de *H. gallinarum* que os percentuais de interação do recuperado das fezes após a passagem no trato gastrintestinal das aves (2,0; 10,5 e 18,8%, respectivamente) com ovos do mesmo nematódeo.

Os percentuais de interação entre *P. chlamydosporia* mantido em laboratório e os ovos tanto de *A. galli* quanto de *H. gallinarum*, apresentaram resultados homogêneos. Verificou-se que o percentual de interação do *P. chlamydosporia* e os ovos de *A. galli* observado em 72h (81,1%) foi consideravelmente superior que o percentual observado nas primeiras em 24h (35,0%). Quanto à interação dos ovos de *H. gallinarum* com *P. chlamydosporia* mantido em laboratório houve percentual de interação maior em 72h (83,8%) do que em 24h (25,5%).

Ramificações de hifas a partir dos clamidósporos de *P. chlamydosporia* no sentido em que se concentravam os ovos de *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. foram observadas em microscópio de luz (objetiva de 10x) e confirmadas posteriormente através do microscópio eletrônico de varredura, caracterizando o processo de colonização da superfície externa dos ovos pelo fungo (Figura 1). Neste microscópio, a energia do feixe de elétrons primários atingiu 14.9kV, a profundidade de penetração para varredura dos materiais foi 10 $\mu$ m, e as magnificações entre 2.9 e 4.6 mil vezes, conforme informações inseridas nas imagens A, B e C.

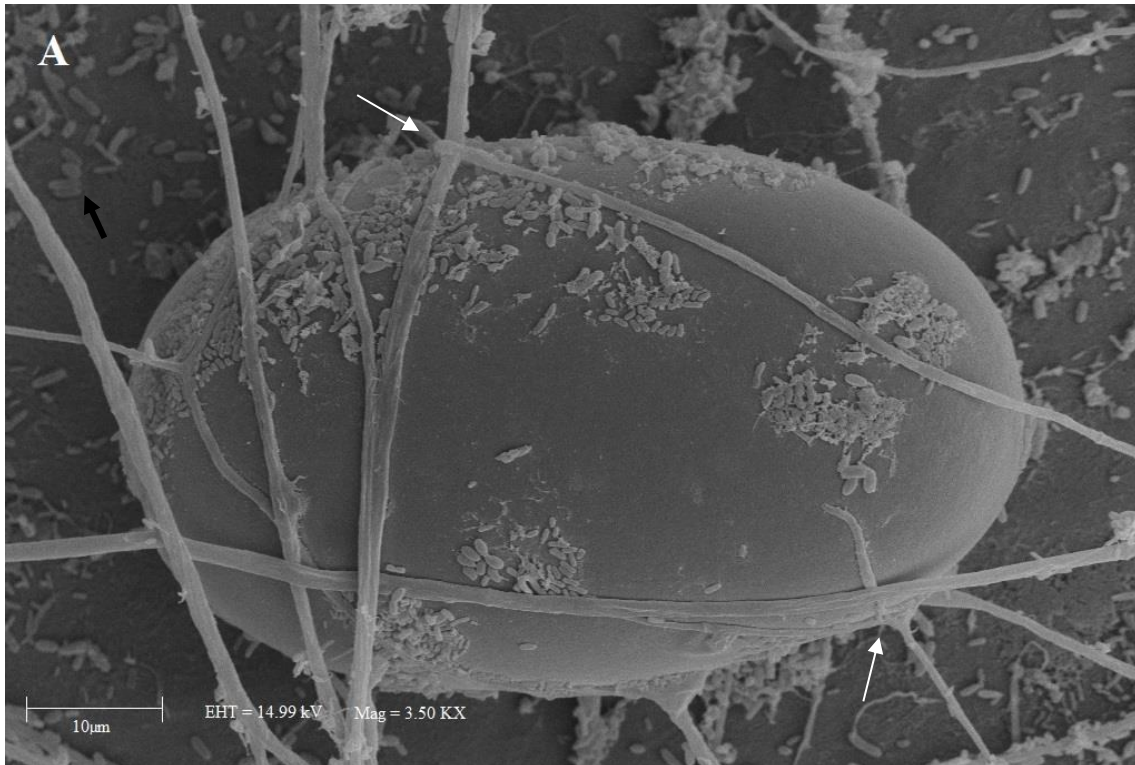




Figura 1 – Elétron-micrografias de varredura da interação, após 8 dias, entre *Pochonia chlamydosporia* e ovos de nematódeos coletados de *Gallus domesticus* abatidos no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2017 a setembro de 2018. Setas brancas apontam hifas colonizando os ovos. **A** – Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e ovo de *Ascaridia galli* (Aumento  $3.5 \times 10^3$ ). **B** – Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e ovo de *Heterakis gallinarum* (Aumento  $2.9 \times 10^3$ ). **C** – Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e ovo de *Tetrameres* sp. (Aumento  $4.0 \times 10^3$ ) Setas pretas apontam presença de bactérias em forma de bastonetes.

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a capacidade de *Pochonia chlamydosporia* de germinar e apresentar atividade ovicida após a passagem pelo trato gastrointestinal de *Gallus domesticus*. Silva et al. (2017), utilizando *G. domesticus* como mesmo modelo biológico, observaram capacidade helmintófaga dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após passagem pelo trato gastrointestinal de aves sobre *Panagrellus* sp. Hiura et al. (2015) demonstraram redução na quantidade de larvas de *Toxocara canis* recuperadas nos órgãos de *G. domesticus* quando inocularam ovos embrionados de *T. canis* após 10 dias de interação *in vitro* com os isolados de *P. chlamydosporia* e *D. flagrans*. Todavia, diferentemente desses autores, que administraram uma solução aquosa contendo conídios e clamidósporos fúngicos por via oral nos animais, no presente trabalho o isolado de *P. chlamydosporia* foi cultivado e

fornecido em dose única, em substrato de milho triturado, contendo  $3,3 \times 10^6$  clamidósporos fúngicos.

A associação entre *P. chlamydosporia* e ovos de nematódeos das espécies *A. galli* e *H. gallinarum* foi bastante significativa neste trabalho ( $p < 0,05$ ), corroborando os resultados observados por Braga et al. (2012), quando testaram o mesmo fungo e extrato enzimático bruto sobre ovos de *A. galli*. O isolado fúngico, no presente trabalho, demonstrou uso potencial na redução do desenvolvimento dos ovos de *A. galli* e *H. gallinarum*, mesmo após passagem pelo trato gastrointestinal de aves. O aumento do percentual de interação com o avanço do tempo de incubação foi observado nos ovos de ambos nematódeos, tanto no isolado mantido em laboratório, quanto no recuperado das fezes.

Contudo, apesar de *P. chlamydosporia* ter mantido sua atividade ovicida após passagem pelo trato gastrointestinal de aves, houve uma redução dessa atividade quando comparado ao teste com o isolado mantido em laboratório antes da passagem. Esse efeito reduzido pode sugerir um processo de fungistase induzido pela competição por recursos nutricionais com outros microrganismos presentes nas fezes das aves. Boer et al. (2003) sugerem que a composição da comunidade microbiana pode exercer atividade antifúngica e, Santos et al. (2012) sugerem que o sucesso do estabelecimento do fungo depende de uma fonte energética para que ele supere a competição com a comunidade microbiana. A capacidade do fungo *P. chlamydosporia* de manter sua viabilidade após a passagem pelo trato gastrointestinal de animais vem sendo estudada ao longo dos anos. Ferreira et al. (2011) demonstraram a manutenção da atividade ovicida de dois isolados desse fungo sobre ovos de *Ascaris suum* após a passagem pelo trato gastrointestinal de suínos e Dias et al. (2012) demonstraram que *P. chlamydosporia* manteve atividade contra ovos de *Fasciola hepatica* após administração desse fungo por via oral e recuperação nas fezes de bovinos. Contudo, nestes trabalhos citados foi utilizada massa micelial de *P. chlamydosporia*, e não clamidósporos, como no presente trabalho.

É importante destacar que a passagem através do trato gastrointestinal de qualquer animal impõe uma série de condições adversas às estruturas fúngicas, tais como diferenças de potencial hidrogeniônico (pH) e ação da microbiota comensal. Dessa forma, apesar da redução no percentual de interação após passagem pelo trato gastrointestinal das aves, observada no presente trabalho, *P. chlamydosporia* ainda exerce importante ação ovicida, comprometendo o ciclo biológico dos nematódeos. Corroborando com essa ideia, Braga e Araújo (2014), afirmaram que uma vez confirmada a viabilidade e germinação

do fungo após passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, o isolado pode ser considerado como um controlador biológico.

A técnica de cultivo em membrana de diálise permite observar a interação fúngica mais detalhadamente (Oliveira et al., 2018). Todavia, essa técnica pode induzir estresse hídrico no organismo e afetar o desempenho do isolado fúngico, reduzindo a penetração mecânica por mudanças na pressão de turgor dos apressórios (Santos et al., 2012). Neste estudo, não foi observada penetração mecânica de *P. chlamydosporia* sobre os ovos dos nematódeos *A. galli*, *H. gallinarum* e *Tetrameres* sp. após 8 dias de interação. Entretanto, as microscopias eletrônicas de varredura revelaram marcas deixadas pelas aderências das hifas fúngicas nas superfícies dos ovos. Conforme já observado em microscopia eletrônica de varredura por Segers (1996), a adesão de hifas fúngicas resultam em marcas na superfície externa das cascas dos ovos, e isso poderia estar relacionado à ação enzimática. Além disso, um tempo maior de exposição dos ovos ao fungo poderia ser mais eficiente na avaliação das estruturas de penetração do fungo à casca do ovo.

Nas microscopias eletrônicas de varredura também foram observadas bactérias em forma de bastonete distribuídas aleatoriamente. Alguns autores apresentam resultados controversos quanto à função dessas bactérias nos isolados de fungos helmintófagos. Duponnois et al. (2000) e Maia et al. (2001) relataram que bactérias denominadas “*Nematophagous Fungus Helper Bacteria*” estariam associadas à maior atividade predatória de fungos helmintófagos, intensificando a ação de fungos do gênero *Arthrobotrys* e *Monacrosporium robustum*. Entretanto, Lopez-Llorca e Boag (1990) ressaltam efeito antagonista, observado como halos de inibição em colônias de *Paecilomyces carneus*, *Acremonium* sp. e *Verticillium suchlasporium*. Contudo, o efeito dessas bactérias observadas nas elétrôn-micrografias não foi completamente elucidado no presente trabalho.

Resultados distintos podem ser justificados devido às diferenças nas metodologias experimentais, materiais utilizados, características morfológicas dos ovos, como também, variações genéticas nos biótipos dos isolados fúngicos. Todavia, o conhecimento sobre a diversidade genética de populações naturais é limitado, bem como os mecanismos efetivos de infectividade e preferência de hospedeiros por *P. chlamydosporia*, o que dificulta a comparação entre resultados de diferentes estudos.

Embora neste trabalho não tenham sido observados com precisão os danos líticos à casca dos ovos de nematódeos através de microscopia eletrônica de varredura, a resistência e capacidade de germinação do isolado de *P. chlamydosporia* confirmam sua

viabilidade de uso como controlador biológico de nematódeos gastrintestinais de *G. domesticus*.

O presente trabalho pôde confirmar a viabilidade de *P. chlamydosporia* após passagem pelo trato gastrintestinal de *G. domesticus*, a possibilidade de ser recuperado nas fezes das aves e ainda apresentar potencial ovicida, indicando a possibilidade de utilização como controlador biológico de nematódeos parasitos de aves domésticas.

## 5. REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual, 2017**. Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 23/08/2018.

ALBINO, L.F.T.; NERY, L.R.; VARGAS JÚNIOR, J.G.; SILVA, J.H.V. **Criação de frango e galinha caipira: avicultura alternativa**. 2.ed, Aprenda Fácil, Viçosa-MG. 2005.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ALFENAS, R.F. **Produção, Determinação e Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão**. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Métodos em Fitopatologia, 2.ed., Editora UFV, Viçosa-MG, 2016.

AMATO, J.F.R.; AMATO, S.B. **Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves**. In: VON MATTER, S. et al. Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Technical Books, Rio de Janeiro-RJ, 2009.

ARAÚJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; FERREIRA, S.R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. **Rev Bras Parasitol Vet**, 22:171–174, 2013.

AVAL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA AVICULTURA ALTERNATIVA. **Galinha Caipira**. Disponível em: <https://www.aval.org.br/index.php#>. Acesso em: 25/11/2018.

BERCHIERI-JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**, 2 ed., FACTA, Campinas-SP, 2009.

BOER, W.; VERHEGGEN, P.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; KOWALCHUK, G.A.; VEEN, J.A. Microbial community composition affects soil fungistasis. **Appl. Environ. Microb.**, 69 (2): 835-844, 2003.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Appl Microbiol Biotechnol**, 98:71–82, 2014.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAÚJO, J.M.; FRASSY, L.N.; TAVELA, A.O.; SOARES, F.E.F.; CARVALHO, R.O.; QUEIROZ, L.M.; QUEIROZ, J.H. *Pochonia chlamydosporia* fungal activity in a solid medium and its crude extract against eggs of *Ascaridia galli*. **J Helminth**, 86: 348-352, 2012.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.M.; FERREIRA, S.R.; CARVALHO, G.R. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Vet Parasitol**, 168: 264–268, 2010.

CARDOZO, S.P.; YAMAMURA, M.H. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina: Ciênc. Agrárias**, 25 (1): 63-74, 2004.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008, 83f.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; CAIXETA, L.B.; XAVIER, D.M.; FERRAZ, S.; FABRY, C.F.S. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc. Agrot. Lavras**, 35 (2): 314-321, 2011.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; PUPPIN, A.C.; PERBONI, W.R. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitol. Res.**, 112: 2131-2136, 2013.

DUPONNOIS, R.; CHOTTE, J.L.; BA, A.M.; ROUSSOS, S. **The Nematophagous Fungi Helper Bacteria (NHB): a new dimension for the biological control of root knot nematodes by trapping fungi.** In: SERA, T. et al. (Eds.) *Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, 2000.

FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; FRASSY, L.N.; FERREIRA, A.S. Biological control of *Ascaris suum* eggs by *Pochonia chlamydosporia* fungus. **Vet Res Commun**, 35 (8): 553–558, 2011.

HIURA, E.; LOPES, A.C.G.; PAZ, J.S.; GAVA, M.G.; FLECHER, M.C.; COLARES, M.; SOARES, F.E.F.; FONSECA, L.A.; LACERDA, T.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R. Fungi predatory activity on embryonated *Toxocara canis* eggs inoculated in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and destruction of second stage larvae. **Parasitol Res.**, *online access*.

KAUFMANN, F.; DAŞ, G.; SOHNREY, B.; GAULY, M. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. **Livest. Sci.**, 141: 182–187, 2011.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; BORDALLO, J. J.; SALINAS, J.; MONFORT, E.; LOPEZ-SERNA, M. L. Use of light and scanning microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**, 33: 61-67, 2002.

LOPEZ-LLORCA, L.V.; BOAG, B. Inhibition of *Verticillium suchlasporium* and other nematophagous fungi by bacteria colonising *Heterodera avenae* females. **Nematol. Medit**, 18: 233-237, 1990.

MACIEL, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BENJAMIN, L.A.; FREITAS, L.G. Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and

destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Micron**, 40: 463–470, 2009.

MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; DI MAURO, A.O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatol. Bras.**, 26 (4): 732-736, 2001.

NORDBRING-HERTZ, B. Dialysis membrane techniques for studying microbial interaction. **Appl. Environ. Microb.**, 45: 399-407, 1983.

OLIVEIRA, I.C.; CARVALHO, L.M.; VIEIRA, I.S.; CAMPOS, A.K.; FREITAS, S.G.; ARAÚJO, J.M.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. V. Using the fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* as a sustainable strategy to reduce numbers of infective larvae of bovine gastrointestinal parasitic nematodes. **J Invertebr Pathol**, 158: 46-51, 2018.

PERMIN, A.; HANSEN, J.W. **Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites**, n.4, FAO Animal Health Manual, Roma, 1998.

SANTOS, M.C.V.; ESTEVES, I.; ABRANTES, I. In vitro water stress bioassays with the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*: Effects on growth and parasitism. **Biol. Control.**, 63: 310–319, 2012.

SEGERS, R. **The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*: aspects of pathogenicity**. Tese (Doutorado). Universidade de Nottingham, 1996. 223f.

SHARMA, N.; HUNT, P.W.; HINE, B.C.; SHARMA, N.K.; WICK, R.A.; RUHNKE I. Detection of *Ascaridia galli* infection in free-range laying hens. **Vet. Parasitol.**, 256: 9-15, 2018.

SILVA, G.S.; ROMERA, D.M.; CONHALATO, G.S.; SOARES, V.E.; MEIRELES, M.V. Helminth infections in chickens (*Gallus domesticus*) raised in different production systems in Brazil. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**, 12: 55-60, 2018.

SILVA, M.E.; SILVEIRA, W.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematicide activity of microfungi (Orbiliales, Orbiliaceae) after transit through gastrointestinal tract of “*Gallus gallus domesticus*”. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, 18 (1): 1-9, 2017.

THAPA, S.; HINRICHSEN, L.K.; BRENNINKMEYER, C.; GUNNARSSON, S.; HEERKENS, J.L.T.; VERWER, C.; NIEBUHR, K.; WILLETT, A.; GRILLI, G.; THAMSBORG, S.M.; SØRENSEN, J.T.; MEJER, H. Prevalence and magnitude of helminth infections in organic laying hens (*Gallus gallus domesticus*) across Europe. **Vet. Parasitol.**, 214: 118–124, 2015.

VICENTE, J.J.; RODRIGUES, H.O.; GOMES, D.C.; PINTO, R.M. Nematoides do Brasil, parte IV: Nematoides de aves. **Rev. Bras. Zool.**, 12 (1): 1-273, 1995.

VIEIRA, F.E.G.; YAMAMURA, M.H.; FREIRE, R.L.; HEADLEY, S.A. The effects of managerial systems on helminth infections in free-range chickens from northern Paraná, Brazil. **Semina: Ciênc. Agrárias**, 36 (6): 4311-4322, 2015.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**, v.III, The Nematode Parasites of Vertebrates, part I; II, Interscience, New York, 1961.

YAZWINSKI, T.; TUCKER, C.; WRAY, E.; JONES, L.; JOHNSON, Z.; STEINLAGE, S.; BRIDGES, J. A survey on the incidence and magnitude of intestinal helminthiasis in broiler breeders originating from the southeastern United States. **J. Appl. Poult. Res.**, 22: 942-947, 2013.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H.C. A revision of *Verticilium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73: 51-8. 2001.

### CAPÍTULO 3

---

**A molecular phylogenetic study of the cecal fluke of poultry, *Postharmostomum commutatum* (= *P. gallinum*) (Trematoda: Brachylaimidae)**

---

Trabalho publicado na revista **Parasitology Research** (JCR 2018: 2.558)

Doi: 10.1007/s00436-018-6102-5

**Marisa Caixeta Valadão<sup>1,2</sup>; Beatriz Martins<sup>2</sup>, Danimar López-Hernández<sup>2</sup>; Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup>; Sean Locke<sup>3</sup>; Hudson Alves Pinto<sup>2</sup>**

1 – Laboratório de Biologia de Trematoda, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30123-970, Brazil.

2 – Department of Veterinary, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

3 – Department of Biology, University of Puerto Rico at Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico.

\*Corresponding author: hudsonalves13@icb.ufmg.br

## ABSTRACT

*Postharmostomum commutatum* (Dietz, 1858), a parasite of the caeca of poultry, has been reported from different parts of the world. Despite its importance, there are no molecular sequences available and its phylogenetic position is unknown in relation to other members of Brachylaimoidea, a group in which taxonomic confusion reigns. To contribute to a better understanding of the taxonomy of these parasites, specimens of *P. commutatum* obtained from the caeca of 3/43 (6.97%) free-range chickens found naturally infected in the municipality of Viçosa, state of Minas Gerais, Brazil, between August 2017 and May 2018, were submitted to morphological and molecular studies. Sequences obtained for the 28S, ITS-2 and *cox-1* genes were compared with sequences available to other species of Brachylaimoidea and subjected to phylogenetic analyses. The results obtained for the three markers and different phylogenetic methods used revealed our sample, morphologically identified as *P. commutatum*, here considered a synonym of *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, formed an isolated lineage from other members of the superfamily Brachylaimoidea, supporting the distinct status of the genus. Despite new sequences are required for a definitive conclusion, the topology of phylogenetic trees obtained suggest that the morphology-based classification of families of Brachylaimoidea can be artificial and new rearrangements of some genera or creation of new families may be necessary to accommodate the members of the superfamily Brachylaimoidea. We hope that the sequences obtained here for the first time to a species of *Postharmostomum* contribute to further studies related to this genus in other areas of the globe, which can confirm the cosmopolitan distribution of *P. commutatum* or reveal a hidden diversity related to this genus of avian trematodes.

**Keywords:** poultry, trematodes, molecular sequences, phylogeny

## 1. INTRODUCTION

Among fluke species that parasitize poultry, *Postharmostomum commutatum* (Diesing, 1858) is most widely distributed, having been reported in Europe, Africa, Americas and Asia (Dawes, 1968; Soulsby, 1982; Taylor et al., 2016). These parasites inhabit the intestinal caeca of birds and may be associated with the occurrence of inflammation and hemorrhages in heavily infected hosts (Alicata, 1964; Soulsby, 1982;

Pence, 1994). The life cycle of the species includes terrestrial molluscs as first and second intermediate hosts, and avian hosts are infected by ingestion of molluscs harboring infective metacercariae (Alicata, 1940; Deiana & Arru, 1963; Duarte, 1980).

*Postharmostomum commutatum* was first reported in the mid-nineteenth century and its taxonomic history has been complex. The parasite was mentioned for the first time by Wagener (1852), who found worms in the caeca of a young chicken from Italy and misidentified the species as *Distoma dimorphum* Diesing, 1850 (currently the clinostomid *Ithyoclinostomum dimorphum*). This error was corrected by Diesing (1858), who described the parasites found by Wagener (1852) as a new species, *Distoma commutatum*. After 7 decades of several reports of the parasite in Europe and Africa, a new genus and species of cecal flukes was described as *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 from parasites found in chicken from Central Asia (Turkestan). Witenberg (1923) transferred *Distoma commutatum* to the new genus *Postharmostomum*, considering it distinct from *P. gallinum* based on the shape of oral sucker, position of genital pore and especially the anterior extent of vitellaria, which reach the pharynx in *P. commutatum* and do not exceed the ventral sucker in *P. gallinum*.

Shortly after it was described, *P. gallinum* was synonymized with *P. commutatum*; the morphological characters upon which it was erected were considered intraspecific or subspecific variations, and Wagener (1852) was thought to have mischaracterized the vitellaria of *P. commutatum* (Joyeux et al., 1928, 1934; Sinitsin, 1931; Dollfus, 1935). This synonymy has been subsequently corroborated by the fact that only parasites with post-acetabular vitellaria were found in the caecum of chickens worldwide, including in areas where *P. commutatum* was originally described (Pereira & Cuocolo, 1939; Deiana & Arru, 1963). Nonetheless, perhaps as a result of this complex history, both names, *P. gallinum* and *P. commutatum*, remain in use for parasites with post-acetabular vitellaria (Travassos et al., 1969; Yamaguti, 1971; Fernandes et al., 2015). A further complication is the generic status of these parasites. Both species have been included in different genera, such as *Mesogonimus* Monticelli, 1888, *Brachylaima* Djardin, 1843 and *Harmostomum* Braun, 1899, with *Postharmostomum* considered as subgenus of *Brachylaimus* or *Harmostomum* by some authors (Witenberg, 1925; Dollfus, 1935; Pereira & Cuocolo, 1939; Dawes, 1968).

In recent times, molecular approaches have enabled reassessment of various aspects of the systematics of trematodes (Blasco-Costa et al., 2016). However, molecular studies of members of the superfamily Brachylaimoidea are scarce and limited to species

originally from Europe (Heneberg et al., 2016). Despite its wide distribution, potential veterinary importance and complex taxonomic history, no molecular studies of *Postharmostomum* Witenberg, 1923 have been performed. Molecular data would seem the best way to resolve the possible synonymy of *P. commutatum* and *P. gallinum*, and also provide insights on the status of *Postharmostomum* in the superfamily Brachylaimoidea.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Between August 2017 and May 2018, the intestines of 43 free-range chickens donated by a proprietor from the municipality of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, were examined for the presence of helminths. Parasites obtained in the cecum were compressed between glass slides and fixed in formalin. Subsequently, they were stained in alum acetocarmine, dehydrated in ethanol series, clarified in beechwood creosote and mounted in permanent slides. The parasites were studied with a light microscope, measured and identified according different authors (Pojmańska, 2002; Fernandes et al., 2015). Vouchers were deposited in the collection of trematodes from Universidade Federal de Minas Gerais (Accession number UFMG-TRE 113).

Prior to fixation in formalin, a subsample of one worm was fixed in 95% ethanol. DNA was extracted from this fragment using the Wizard® Genomic DNA Purification kit and dosage in a microvolume spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000). We amplified partial regions of the genes 28S rDNA, ITS-2 and *cox-1*, using the primer pairs Dig12/1500R, 3S/BD2 and JB3/COI-R Trema (Tkach et al., 2003; Bowles et al., 1995; Miura et al., 2005). PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl, which included 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Polymerase DNA Polymerase, 1.25 pmol of each primer, about 50 ng of template DNA and sterile ddH<sub>2</sub>O. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and the band of expected size was purified with polyethylene glycol (PEG) (20% PEG 8,000 (Promega) in 2.5 M NaCl solution. Purified DNA was sequenced in both directions by capillary electrophoresis in an ABI3730 sequencer using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit.

Sequence chromatograms obtained were aligned and edited using the ChromasPro v.2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Australia) and contigs were used for phylogenetic analyses. They were compared with sequences of species of Brachylaimoidea available in GenBank obtained with BLAST searches (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The

sequences were initially aligned using the program MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) and due to visually apparent artifacts in the alignment, ITS2 sequences were realigned with MAFFT (Kato et al. 2013) and assessed with GUIDANCE (Penn et al. 2010). Two low-scoring ITS2 sequences were excluded from further analysis (*Urotocus rossitensis* KP903702, *Urogonimus macrostomus* KP903704, GUIDANCE scores of 0.771 and 0.758, respectively). For phylogenetic analyses we used the method of Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). The evolutionary models used for the analyses were determined by Bayesian information criterion (BIC) in MEGA 7.0, corresponding to GTR+G for 28S, K2 for ITS-2 and HKY+G+I for COI. ML analyses were performed in MEGA7 and the nodal support was measured using the bootstrap test with 1000 replicates. BI analyses were performed with MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al., 2012) using Markov chain Monte Carlo (MCMC) for 1,000,000 generations and sampling every 100 generations. The burn-in was established for the first 25% of the trees sampled and nodal support was estimated with posterior probability. Sequences obtained were deposited in GenBank under the accession numbers MH915390, MH915391, and MH919409.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In total, 32 trematode specimens were recovered from the caeca of 3/43 (6.9%) chickens (intensities of infection of 1, 9, 22). The morphology of the parasite (Figure 1A) is similar to that described for *P. commutatum* (= *P. gallinum*) by different authors.



Figure 1: *Postharmostum commutatum* found in the caecum of a chicken from Brazil. (A) Entire view of fluke. (B) Details of middle third of the parasite shown the post-acetabular position of the vitellaria. Scale bars: 3mm (A) 1mm (B).

The post-acetabular extent of vitellaria (figure 1B) was evident in all specimens evaluated in our study. The measures of the parasites obtained are presented in Table 1.

Table 1: Morphometric data of *Postharmostomum commutatum* found in the caeca of free-ranged chickens (*Gallus gallus domesticus*) from the municipality of Viçosa, state of Minas Gerais, Brazil. Data are presented in micrometer (unless otherwise indicated) and are given by mean followed by the standard deviation and range between parentheses. Abbreviation: L: length; W: width.

Body	L	12.75 ± 1.74 (9.66-16.90) mm
	W	2.79 ± 0.39 (2.41-4.05) mm
Oral sucker	L	1203 ± 95 (1070-1397)
	W	1034 ± 134 (726-1143)
Ventral sucker	L	970 ± 85 (798-1179)
	W	918 ± 92 (816-1252)
Pharynx	L	504 ± 87 (417-871)
	W	470 ± 71 (399-780)
Anterior teste	L	865 ± 250 (272-1179)
	W	851 ± 196 (453-1342)
Posterior teste	L	1000 ± 248 (399-1379)
	W	770 ± 147 (472-1052)
Ovary	L	527 ± 192 (272-1215)
	W	621 ± 137 (453-998)
Eggs	L	34 ± 1 (33-35)
	W	18 ± 1 (16-20)

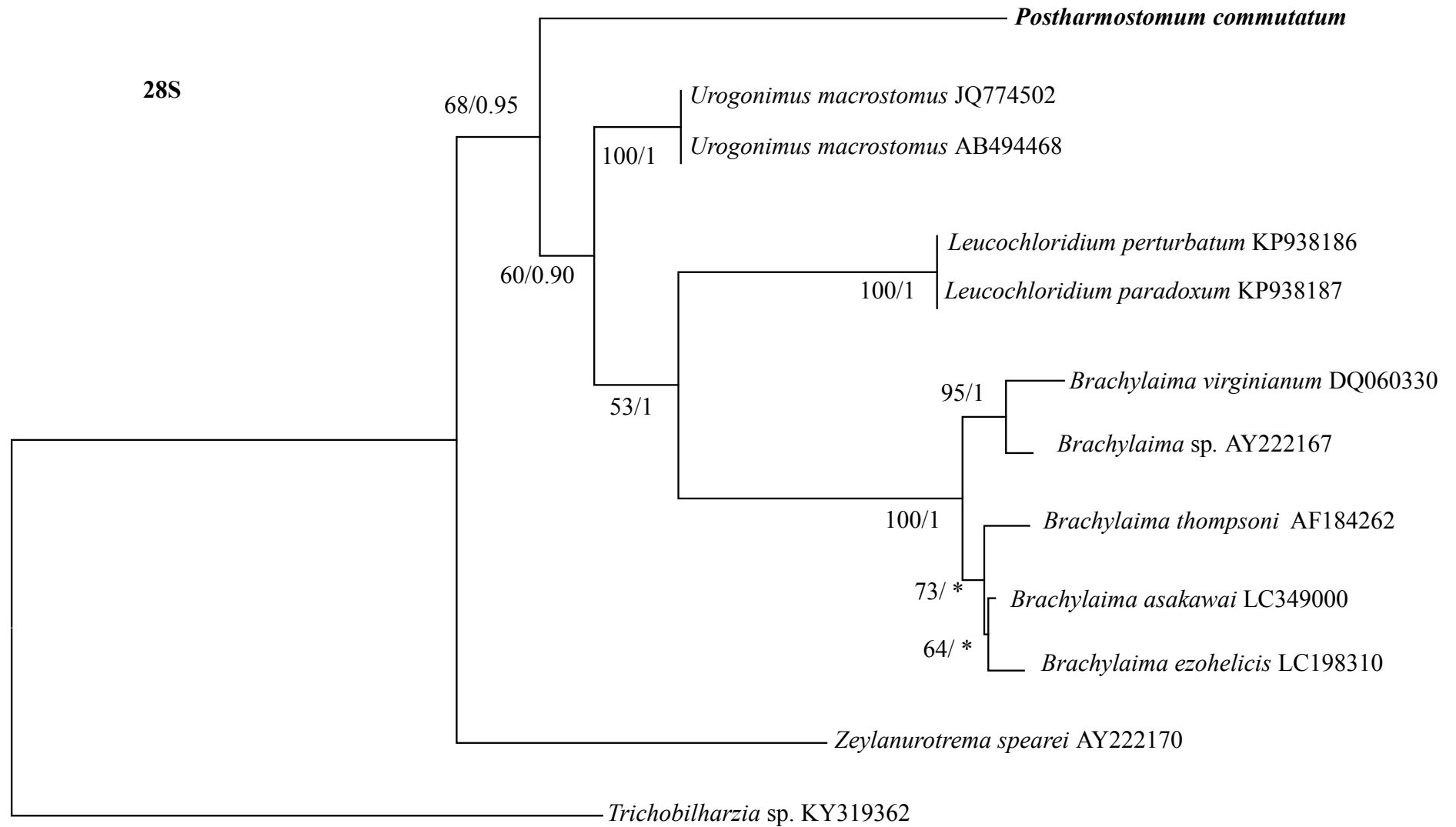
Sequences of 1235, 465 and 912 bp were obtained for 28S, ITS-2 and *cox-1* sequences, respectively. They differ from sequences available in GenBank, as verified by BLAST searches (similarity  $\leq 91\%$ ,  $\leq 97\%$  and  $\leq 80\%$  for 28S, ITS-2 and *cox-1*). The trimmed alignments were 1207, 202, 299 bp in length for 28S, ITS-2 and *cox-1* sequences, respectively. Sequences of some species of Brachylaimoidea available for the molecular markers used were not considered for analysis because they left the final dataset for analysis significantly smaller. Molecular divergences between *P. commutatum* and other species of Brachylaimoidea used in the analyses are shown in Table 2.

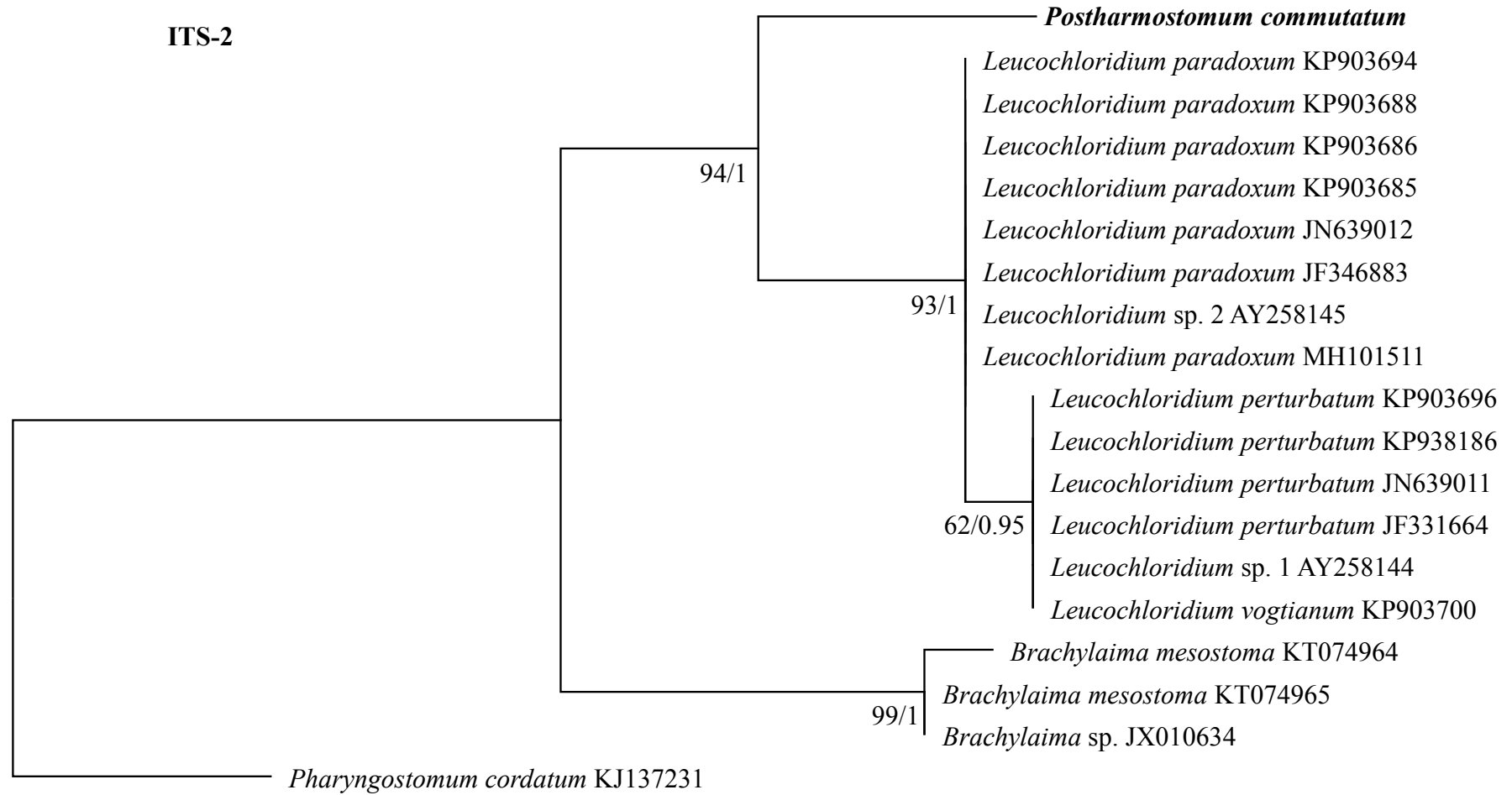
Table 2. Genetic differences (pairwise comparison in percentages) in 28S, ITS2 and *Cox-1* sequences among *Postharmosthomum commutatum* and other member of the superfamily Brachylaimoidea

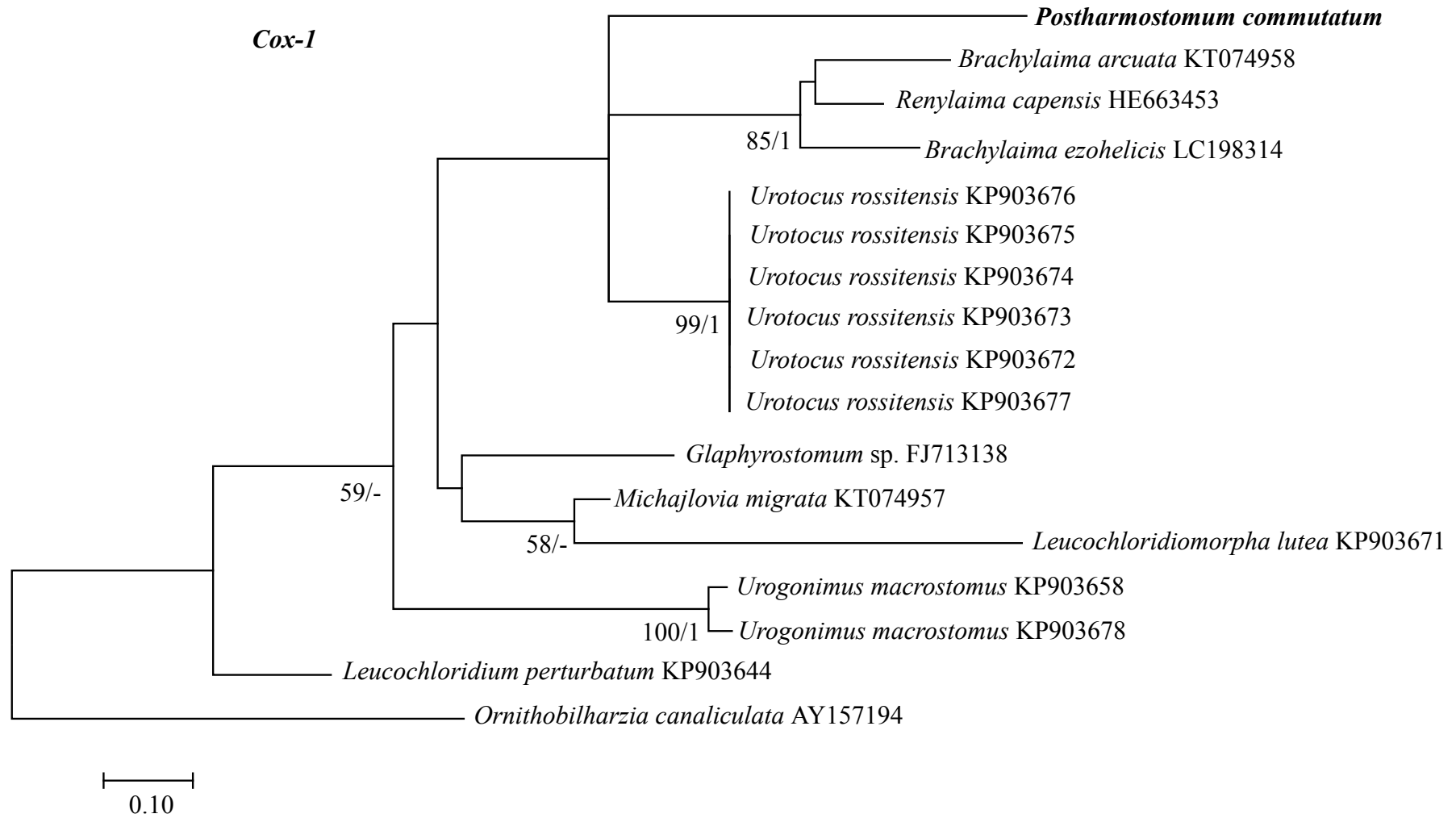
	<i>Postharmosthomum commutatum</i>		
	28S	ITS-2	<i>Cox-1</i>
<i>Brachylaima</i> sp.	14.9	6.9	-
<i>Brachylaima arcuata</i>	-	-	19.0
<i>Brachylaima ezohelicis</i>	15.2	-	20.2
<i>Brachylaima mesostoma</i>	-	6.9-7.5	20.2-21.0
<i>Brachylaima thompsoni</i>	15.0	-	-
<i>Brachylaima virginianum</i>	15.2	-	-
<i>Leucochloridium perturbatum</i>	15.2	4.6	20.2-21.4
<i>Leucochloridium paradoxum</i>	15.2	4.0	-
<i>Leucochloridiomorpha lutea</i>	-	-	23.8
<i>Michajlovia migrata</i>	-	-	19.8
<i>Renylaima capensis</i>	-	-	19.4
<i>Urogonimus macrostomus</i>	11.3	-	17.1-19.4
<i>Urotocus rossitensis</i>	-	-	17.1

Phylogenetic trees obtained by ML and BI analyses were in some respects similar regardless of molecular marker. *Postharmostomum commutatum* always emerged as deeply divergent and distinct from other brachylaimoids, supporting the validity of the genus. In general, topology of trees obtained revealed that our isolate of *P. commutatum* to be an early divergent lineage in the superfamily Brachylaimoidea (Figure 2). However, the relationships between genera and families of the superfamily Brachylaimoidea varied depending on the marker, as described below.

Figure 2: Phylogenetic relationship between *Postharmostomum commutatum* (in bold) and other species of Brachylaimoidea, as inferred from sequences of 28SrDNA (A), (B) ITS2 and (C) *cox-1* analyzed by Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods. Nodal support is indicated as ML/BI; values < 0.90 (BI) and < 50 (ML) are indicated by a dash. Asterisks indicate clades that were not present in tree obtained by BI.







The tree obtained from 28S sequences showed that *P. commutatum* occupies a basal position in relation to *Urogonimus*, *Leucochloridium* and *Brachylaima*. In addition, the topology of the tree suggests paraphyly of both of the family Leucochloridiidae and Brachylaimidae. *Urogonimus* and *Leucochloridium*, currently members of Leucochloridiidae, did not form a monophyletic group. This same situation was verified in relation the species of the brachylaimids *Postharmostomum*, *Brachylaima* and *Zeylanurotrema*. However, the statistical support of nodes in the foregoing observations was generally weak, particularly in ML bootstraps. Our phylogenetic data suggest that the families Brachylaimidae and Leucochloridiidae are paraphyletic, a phenomenon firstly reported by Olson et al. (2003) when evaluating the phylogeny of Trematoda and considering 5 species of Brachylaimoidea (*Brachylaima* sp., *Brachylaima thompsoni*, *Zeylanurotrema spearei*, *Leucochloridium perturbatum* and *Urogonimus macrostomus*).

Further studies, particularly increased taxon sampling, are needed to reorganize this superfamily in light of 28S phylogenetic data. Such studies may reveal that the current morphology-based grouping of families and genera of brachylaimoids according to Pojmańska (2013) requires revision. New families may be needed to accommodate genera, such as *Postharmostomum* and *Zeylanurotrema* in light of the molecular divergence in the 28S region and the topology of the phylogenetic trees. The molecular divergence in 28S between *P. commutatum* and other genera considered in the analyses (11.3-15.6%) was similar to that between *Brachylaima* and *Leucochloridium* (11.9-12.6%) and between *Urogonimus* and *Brachylaima* (10-11%). Divergence between *Urogonimus* and *Leucochloridium* was slightly lower (8.9%). *Zeylanurotrema spearei* differed by 11.7-15.3% in relation to species considered in the analyses. In other groups of Diplostomida, similar differences have been found between species belong to different families. For instance, similar differences in 28S have already been reported between Schistosomatidae and Sanguinicolidae (9.8–13.7%) and Schistosomatidae and Spirorchiidae (6.7–10.1%) (Brant et al., 2006). The differences in 28S sequences between species belonging to a same family of Diplostomata are generally lower than that verified between *P. commutatum* and other Brachylaimoidea, as verified in Schistosomatidae (0.5-7.1%; Brant et al., 2006). For further comparative purposes, we aligned 40 28S sequences from Diplostomatans in Blasco-Costa et al. (2016), Hernandez-Mena et al (2017) and Locke et al. (2018) (AF184263-4, AY222171-3, FJ609420, HM114365, JF820597, JF820607, KM258670, KT254022-3, KT334165, KT334167, KT728782, MF398320-31, MF398334-9, MH521246-52). Interspecific 28S divergence ranged from

1.5-2.4% (within Clinostomidae), 0.4-7.4% (within the combined Strigeidae and Diplostomidae) and 5.9-7.5% (within the combined Cyathocotylidae and Brauninidae).

In a tree obtained from ITS-2, although considering only three genera of the superfamily, clearly reveals, in a well-supported clade, the grouping *P. commutatum* as a sister group of species of *Leucochloridium*. The species of *Brachylaima* considered in the analysis form a distinct clade. Divergence in ITS-2 between *P. commutatum* and *Leucochloridium* spp. (4-4.6%) was lower than between *P. commutatum* and *Brachylaima* spp. (6.9-7.5%). These differences in ITS-2 region, as well as between *Leucochloridium* spp and *Brachylaima* spp. (6.4-7.5%), can support these three genera can belonging to a same family. In fact, these differences in ITS-2 are similar or lower than that reported to species belonging to different genera belong to a same family of trematode, including representatives of the Diplostomida (revised by Nolan et al., 2005). Moreover, a similar difference was reported to ITS-2 region of *Leucochloridium variaie* and *L. paradoxum* (5.1%) (Casey et al., 2003). This data also supports that the genera *Leucochloridium*, *Brachylaima* and *Postharmostomum* can belong to the same family. Curiously, the ITS2 divergence values among many of the same sequences reported by Heneberg et al. (2016) were significantly higher (intergeneric divergences of 18.3-30.5%). We suspect this is because these authors used a different substitution model and included difficult to align sequences of *Urotocus rossitensis* and *Urogonimus macrostomus* in their analysis.

In the phylogeny based on *cox-1* sequences, *P. commutatum* was placed in a clade with *Urotocus rossitensis* + *Brachylaima* spp. + *Renylaima capensis*, the first of which is considered a member of the Leucochloridiidae. The results obtained also suggest the synonymy between *Brachylaima* and *Renylaima*, as previously proposed by Heneberg et al. (2016). The occurrence of paraphyly between the members of family Leucochloridiidae is suggested by *cox-1* data, given that species of *Leucochloridium*, *Urotocus* and *Urogonimus* do not form a monophyletic clade. The topology of the obtained tree also reveals the formation of a clade containing *Glaphyrostomum* sp., *Michajlovia migrata* and *Leucochloridiomorpha lutea*, the latter currently included in the family Leucochloridiomorphidae Yamaguti, 1958.

The phylogenetic results obtained by the different markers show that new studies, including obtaining sequences for a larger number of species as well as fragments with a larger number of bases, especially *cox-1* or other mitochondrial markers, are necessary in order to better understand taxonomic aspects of the representatives of the superfamily

Brachylaimoidea. However, the molecular data here obtained confirm *Postharmostomum* is distinct from other genera of the family Brachylaimidae, including the genus *Brachylaima*, with which it has been included in the past. The DNA sequences from *Postharmostomum* we provide are also an important step toward resolution of the long history of taxonomic uncertainty related to species in this genus. Sequences from other isolates of *Postharmostomum* spp., especially from Europe and Asia, will be enlightening. Such data, in comparison with DNA sequences we have obtained, may confirm the cosmopolitan distribution of *P. commutatum* or reveal a hidden diversity related to this genus of avian trematodes. Unless future molecular and morphological work confirms the existence of genetically distinct parasites belonging to *Postharmostomum* with vitellaria extending to the anterior portion of the body, as described by Wagener (1852), we suggest the use of the name *P. commutatum* (= *P. gallinum*) for this cecal fluke of poultry.

Our data may also prove useful in future molecular studies of the evolutionary history of the global spread of *P. commutatum*. We speculate that population genetics will show an Asiatic origin of this species, similar to that of its main definitive host, chickens (*Gallus gallus domesticus*) (Miao et al., 2013; Xiang et al., 2014). Given that chicken is one of the most common and widespread domestic animals, the cosmopolitan distribution of their parasites is intuitive. However, the spread of *P. commutatum* also requires the first intermediate host, *Bradybaena similaris*. This snail also has Asian origin and is invasive in several parts of the world (Cowie et al., 2008); in the New World, it was reported naturally infected with *P. commutatum* in USA and Brazil (Alicata, 1940; Duarte, 1980; Amato & Bezerra, 1992).

## 5. REFERENCES

ALICATA, J.E. The life cycle of *Postharmostomum gallinum* the cecal fluke of poultry. **J Parasitol**, 26 (2):135-143. 1940.

ALICATA, J.E. **Parasitic infections of man and animals in Hawaii**. Tech. Bull. Hawaii Agric. Exp. Sta, 1964.

AMATO, S.B.; BEZERRA. J.C. Concurrent infection of *Postharmostomum gallinum* (Digenea, Brachylaimidae) and *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae) in

Bradybaena similaris (Stylommatophora, Xanthonichidae). **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, 87: 309-311, 1992.

BLASCO-COSTA, I.; CUTMORE, S.C.; MILLER, T.L.; NOLAN, M.J. Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. **Syst Parasitol**, 93(3):295-306, 2016.

BLASCO-COSTA, I.; POULIN, R.; PRESSWELL, B. Species of *Apatemon* Szidat, 1928 and *Australapatemon* Sudarikov, 1959 (Trematoda: Strigeidae) from New Zealand: linking and characterising life cycle stages with morphology and molecules. **Parasitol. Res.**, 115(1):271-89, 2016.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D.P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. **Mol Phylogenet Evol.** 4 (2):103-109, 1995.

BRANT, S.V.; MORGAN, J.A.; MKOJI, G.M.; SNYDER, S.D.; RAJAPAKSE, R.P.; LOKER, E.S. An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages. **J Parasitol.**, 92 (1): 77-88, 2006.

CASEY, S.P.; BAKKE, T.A.; HARRIS, P.D.; CABLE, J. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloriidae). **Syst Parasitol.**, 56 (3): 163-168, 2003.

COWIE, R.H.; HAYES, K.A.; TRAN, C.T.; MEYER III, M.M. The horticultural industry as a vector of alien snails and slugs: widespread invasions in Hawaii.— **Int. J Pest Manage.**, 54: 267-276, 2008.

DAWES, B. **The Trematoda With Special Reference to British and Other European Forms**. Cambridge University Press, London, 1968.

DEIANA, S.; ARRU, E. II ciclo biologico di *Postharmostomum commutatatum* (Dies, 1858) ricostruito sperimentalmente in Sardegna. **Riv. Parassitol.**, 24(3):163-177, 1963.

DIESING, K. M. **Revision der Myzhelminthen. Abtheilung: Trematoden.** S B Akad Wiss Wien, 32:307–390, 1858.

DOLLFUS, R.P. Sur quelques *Brachylaemus* de la faune française récoltés principalement a Richelieu (Indre et Loire). **Ann. Parasitol Hum Comp.**, 13: 52-79, 1935.

DUARTE, M.J.F. The life cycle of *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, 40(4): 793-809, 1980.

FERNANDES, B.M.M.; JUSTO, M.C.N.; CÁRDENAS, M.Q.; COHEN, S.C. **South American Trematodes Parasites of Birds and Mammals**, Oficina de Livros, Rio de Janeiro, 2015.

HENEBERG, P.; SITKO, J.; BIZOS, J. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida). **Parasitol.**, 143 (4): 455-74, 2016.

HERNÁNDEZ-MENA, D.; GARCÍA-VARELA, M.; DE LEÓN, G.P. Filling the gaps in the classification of the Digenea Carus, 1863: systematic position of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 within the superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Sys Parasitol.**, 94(8):833-48, 2017.

JOYEUX, C.; HOUEMER, E. Recherches sur la faune helminthologique d l'Indochine (Cestodes et Trématodes). **Ann Parasitol Hum Comp.**, 6:27–58, 1928.

JOYEUX, C.; BAER, J. G.; TIMON-DAVID, J. Recherches sur les trematodes du genre *Brachylaemus* Dujardin (syn. *Harmostomum* Braun). **Bull. Biol. Fr. Belg.**, 68: 385–418, 1934.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.**, 30 (4): 772-780, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.**, 33: 1870-1874, 2016.

LOCKE, S.A.; VAN DAM, A.R.; CAFFARA, M.; PINTO, H.A.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; BLANAR, C. Validity of the Diplostomoidea and Diplostomida (Digenea, Platyhelminthes) upheld in phylogenomic analysis. **Int J Parasitol.**, 2018.

MIAO, Y.W.; PENG, M.S.; WU, G.S.; OUYANG, Y.N.; YANG, Z.Y.; YU, N.; LIANG, J.P.; PIANCHOU, G.; BEJA-PEREIRA, A.; MITRA, B.; PALANICHAMY, M.G.; BAIG, M.; CHAUDHURI, T.K.; SHEN, Y.Y.; KONG, Q.P.; MURPHY, R.W.; YAO, Y.G.; ZHANG, Y.P. Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. **J Hered.**, 110(3):277-82, 2013.

MIURA, O.; KURIS, A.M.; TORCHIN, M.E.; HECHINGER, R.F.; DUNHAM, E.J.; CHIBA, S. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). **Int J Parasitol.**, 35: 793–801, 2005.

NAKAO, M.; SASAKI, M.; WAKI, T.; ANDERS, J.L.; KATAHIRA, H. *Brachylaima asakawai* sp. nov. (Trematoda: Brachylaimidae), a rodent intestinal fluke in Hokkaido, Japan, with a finding of the first and second intermediate hosts. **Parasitol Int.**, 67 (5): 565-574, 2018.

NAKAO, M.; WAKI, T.; SASAKI, M.; ANDERS, J.L.; KOGA, D.; ASAKAWA, M. *Brachylaima ezohelicis* sp. nov. (Trematoda: Brachylaimidae) found from the land snail *Ezohelix gainesi*, with a note of an unidentified *Brachylaima* species in Hokkaido, Japan. **Parasitol Int.**, 66 (3): 240-249, 2017.

PENCE, D.B. Postharmostomiasis in wild turkeys in New Mexico. **J Wildl Dis.**, 30 (2): 285-286, 1994.

PENN, O.; PRIVMAN, E.; ASHKENAZY, H.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; PUPKO, T. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. **Nucleic Acids Res.**, 38 (2): 23-28, 2010.

PEREIRA, C.; CUOCOLO, R. A propósito de *Postharmostomum commutatum*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 10 (4): 73-88, 1939.

POJMAŃSKA, T. **Family Brachylaimidae Joyeux & Foley 1930**. In: GIBSON, D.I.; JONES, A.; BRAY, R.A. (Eds.), *Keys to the Trematoda*, Ed. CABI, London, 2002.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst Biol.**, 61(3): 539-542, 2012.

SINITZIN, D. Studien über die Phylogenie der Trematoden, V: revision of Harmostominae in the light of new facts from their morphology and life history. **Z Parasitenkd.**, 3:785–835, 1931.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**, 7 ed., Baillière Tindall, London, 1982.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**, 4 ed., John Wiley and Sons Inc., England, 2016.

TKACH, V.V.; LITTLEWOOD, D.T.J.; OLSON, P.D.; KINSELLA, J.M.; SWIDERSKI, Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Syst Parasitol.**, 56: 1–15, 2003.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J.F.T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 67: 1-886, 1969.

VIEIRA, F.E.G.; YAMAMURA, M.H.; FREIRE, R.L.; ARLINGTON, H.S. The effects of managerial systems on helminth infection in free-range chickens from northern Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, 36 (2): 4311-4322, 2015.

XIANG, H.; GAO, J.; YU, B.; ZHOU, H.; CAI, D.; ZHANG, Y.; ZHAO, X. Early Holocene chicken domestication in northern China. **Proc. Natl Acad Sci**, 111 (49): 17564–17569, 2014.

WAGENER, G. R. Entelminthia, n. III, Archiv, für. **Anat. Physiol.**, 555-567, 1852.

WITENBERG, G. Harmostominae. In Skryabin K. I. [Trematodes of domestic birds], **Arb Inst. Exp. Vet.**, Moscow, 1 (2): 193-256, 1923.

WITENBERG, G. Versuch ether Monographie der Trematoden Unterfamilie Harmostominae Braun. Zool. Jb., **Abt. Syst.**, 51: 167-254, 1925.

YAMAGUTI, S. **Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates**. Vol. I, II. Keigaku Publishing Co., Japan, 1971.

## ANEXO 1

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de pesquisa:** “*Pochonia chlamydosporia* no controle biológico de helmintos parasitos gastrintestinais de galinhas criadas em sistema caipira (*Gallus gallus domesticus* LINNAEUS, 1758)”.

**Aluna de mestrado:** Marisa Caixeta Valadão

**Orientador:** Jackson Victor de Araújo

Sua criação de aves reúne as características necessárias para participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa e se houver dúvida, teremos prazer em esclarecê-la. A doação das vísceras e trato gastrintestinal de seus animais neste estudo será de grande importância para nós, mas caso queira desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você nem à sua criação. Ao concordar, o documento deverá ser assinado, e só então daremos início ao estudo.

Eu, \_\_\_\_\_, portador (a) do RG \_\_\_\_\_, residente e domiciliado (a) em \_\_\_\_\_, cidade de \_\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade doar vísceras e o trato gastrintestinal dos animais (frangos e galinhas) que eu vier a abater em minha residência para consumo próprio, sendo que este material necessário ao projeto de pesquisa seria descartado, não possuindo qualquer utilidade para mim. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como os devidos esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo está sendo proposto para que se possa ampliar nosso conhecimento sobre o controle biológico alternativo de verminoses em aves criadas em piso;
  - II) As doações serão feitas à medida que eu informe aos envolvidos na pesquisa sobre o abate e eles vierem até minha residência recolher o que usualmente eu descartaria (trato gastrintestinal);
  - III) A participação neste projeto não tem fins terapêuticos, nem terá custo algum para mim;
  - IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação; sendo que a desistência não me causará nenhum prejuízo;
  - VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meu nome não seja mencionado;
  - VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final do estudo;
  - IX) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. ( )
- Sim ou ( ) Não

Viçosa, de de 201\_.

\_\_\_\_\_  
Proprietário responsável pelo animal

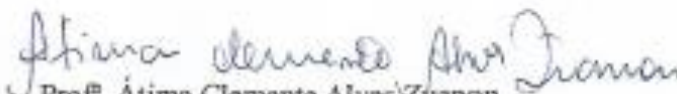
## ANEXO 2

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 69/2017, intitulado "*Pochonia chlamydosporia* no controle biológico de helmintos parasitos gastrintestinais de galinhas criadas em sistema caipira (*Gallus galus domesticus* LINNAEUS, 1758)", coordenado pelo professor Jackson Victor de Araújo do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/12/2017, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 69/2017, named "*Pochonia chlamydosporia* in the biological control of helminth gastrointestinal parasites of chickens reared in a hickory system (*Gallus galus domesticus* LINNAEUS, 1758)", is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 04, 2017 valid for 12 months.

  
Prof. Átima Clemente Alves Zuanon  
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV