

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós - Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Suscetibilidade de fungos nematófagos a fármacos
antiparasitários**

Juliana Nunes Vieira

Pelotas, 2012

JULIANA NUNES VIEIRA

**SUSCETIBILIDADE DE FUNGOS NEMATÓFAGOS A FÁRMACOS
ANTIPARASITÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V658s

Vieira, Juliana Nunes

Suscetibilidade de fungos nematófagos a fármacos antiparasitários / Juliana Nunes Vieira. – 50f. : tab. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Pelotas, 2012. – Orientador Patrícia da Silva Nascente ; co-orientador Daniela Isabel Brayer Pereira.

1.Parasitologia. 2.Fungos nematófagos. 3.Controle biológico. 4.Teste de suscetibilidade. 5.Helmintos. 6. Antiparasitários. I.Nascente, Patrícia da Silva. II.Pereira, Daniela Isabel Brayer. III.Título.

CDD: 616.015

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas

.....
Prof^a. Dr^a. Maria Elizabeth Aires Berne

.....
Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

.....
Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente
(orientadora)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado e por ter me dado força, inspiração e perseverança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu noivo e companheiro, Marcos, minha eterna gratidão, amor e reconhecimento pela grande ajuda, força, compreensão e carinho durante todo o tempo.

Aos meus pais Salatiel e Etienne pelo incentivo, apoio e pelo amor de sempre.

Agradeço por sempre acreditarem em mim e por ensinarem que na vida nunca devemos desistir de nossos sonhos.

Aos meus irmãos, Caio e Manuela, meus maiores amigos, fiéis companheiros, agradeço pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Às minhas queridas avós Arlinda e Dalva, pelo amor fraterno e por estimularem e apoiarem a busca deste objetivo.

À Prof. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente, pela orientação, amizade, incentivo, pela credibilidade a mim conferida, e por suas sugestões e conhecimentos na realização deste projeto.

À Prof. Dr^a. Daniela Brayer Pereira, pela valiosa colaboração, apoio e parceria neste estudo como co-orientadora, auxiliando sempre que eu necessitava.

Aos colegas de laboratório Fernando, Graci, Carol, Josi, Bruna, Júlia e Fran, por todos os momentos bons compartilhados, pela amizade e grande ajuda no decorrer dessa jornada.

À UFPel e à coordenação do Programa de Pós-Graduação de Parasitologia, pela oportunidade única de crescimento profissional e pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

Resumo

VIEIRA, Juliana Nunes. **Suscetibilidade de fungos nematófagos a fármacos antiparasitários.** 2012. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

O rápido desenvolvimento de resistência de parasitos do trato gastrintestinal a anti-helmínticos tem demonstrado limitada eficiência desse método para o controle de determinadas endoparasitoses em ruminantes, incentivado assim, pesquisas com métodos alternativos de controle parasitário. A utilização de compostos químicos no tratamento anti-helmíntico de animais, em associação com fungos nematófagos usados no controle biológico, é uma estratégia que vem se mostrando eficaz para a redução da densidade populacional de nematódeos nos animais de produção e pouco se sabe sobre seu emprego simultâneo. Este trabalho teve por objetivo verificar, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a suscetibilidade *in vitro* dos fungos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii* e *Paecilomyces variotii* aos antiparasitários albendazol, tiabendazol e ivermectina (100%), levamisol (7,5%) e closantel (10%). As CIMs variaram de 4 a 0,031 μ g/mL para albendazol, tiabendazol e ivermectina, de 0,937 a 0,117 μ g/mL para o levamisol e de 0,625 a 0,039 μ g/mL para o closantel, dependendo do fungo testado. Os resultados mostram que todos os antiparasitários testados tiveram efeito inibitório *in vitro* sobre os fungos nematófagos, podendo comprometer suas ações como bioagentes de controle biológico.

Palavras-chave: Controle Biológico, Teste de suscetibilidade, Antiparasitários, Fungos nematófagos.

Abstract

VIEIRA, Juliana Nunes. **Susceptibility of nematophagous fungi to antiparasitic drugs.** 2012. 50f. Dissertation (Master in Science) – Postgraduate Program in Parasitology. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS.

The rapid development of resistance to gastrointestinal parasites anthelmintics has shown the limited efficiency of this method in the suppression of endoparasitoses in ruminants, and has furthered research in alternative control methods. The use of chemicals in animal anthelmintic treatment, in association with nematophagous fungi used for biological control, is a strategy that has proven to be effective in reducing the nematode population density of farm animals. This study aims to verify the *in vitro* susceptibility of the nematophagous fungi *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii* and *Paecilomyces variotii* against the antiparasitic drugs albendazole, thiabendazole, ivermectin (100%), levamisole (7.5%) and closantel (10%) by using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). MICs ranged between 4 and 0,031 μ g/mL for albendazole, thiabendazole and ivermectin, between 0,937 and 0,117 μ g/mL for levamisole, and between 0,625 and 0,034 for closantel. The results obtained showed that all antiparasitic drugs tested had an *in vitro* inhibitory effect on nematophagous fungi, being able to jeopardize the fungus action as a biological control bioagent.

Key-words: Biological control, Susceptibility test, Antiparasitic, Nematophagous fungi.

Lista de figuras

- Figura 1A - Cultura de dez dias de *Duddingtonia flagrans* em Potato Dextrose Agar (PDA), 25°C..... 25
- Figura 1B - Clamidósporos de *Duddingtonia flagrans*. Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x)..... 25
- Figura 2A - Cultura de dez dias de *Arthrobotrys oligospora* em Potato Dextrose Agar (PDA), 25°C..... 26
- Figura 2B: Macroconídeos característicos de *Arthrobotrys oligospora*. Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x)..... 26
- Figura 3A - Cultura de dez dias de *Paecilomyces lilacinus* em Potato Dextrose Agar (PDA), 25°C..... 27
- Figura 3B - Microconídeos característicos de *Paecilomyces lilacinus*. Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x)..... 27

Lista de Tabelas

Tabela 1	Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos cinco fármacos antiparasitários estudados frente aos sete fungos nematófagos.....	35
----------	--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Parasitoses gastrintestinais de ruminantes.....	14
2.2 Fármacos antiparasitários.....	16
2.3 Controle biológico.....	20
2.4 Fungos nematófagos.....	22
3. ARTIGO.....	29
4. CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO	54

1. INTRODUÇÃO

O parasitismo causado por nematódeos gastrintestinais é reconhecido mundialmente como fator limitante na criação de ruminantes, e são frequentes os relatos de morbidade e mortalidade desses animais devido aos quadros típicos de verminoses. O controle de endoparasitos dos animais de produção, geralmente, é realizado pelo uso de anti-helmínticos pertencentes a diferentes grupos químicos (SILVA et al., 2009; VIEIRA et al., 2009).

O uso intensivo desses fármacos é o fator mais importante para o surgimento da resistência parasitária. Isto é agravado devido à facilidade que o produtor tem em adquirir tais medicamentos, somado à administração, muitas vezes errônea, dos mesmos. (MOLENTO, 2004). Com isso, o rodízio de princípios ativos é aleatório e, às vezes, realizado com intervalos muito curtos, em épocas ou em categorias animais inadequadas e, até mesmo, contra uma espécie de helminto pouco sensível ao medicamento. Medidas preventivas baseadas nestas informações podem contribuir para a redução na frequência de tratamentos químicos e, quando associadas a outras formas de controle, podem reduzir a dependência aos anti-helmínticos (BARGER, 1999).

Com isso, o controle biológico com fungos nematófagos pode ser empregado para diminuir populações de parasitos, já que estes são seus antagonistas naturais. A administração desses fungos aos animais de produção é considerada uma promissora alternativa na profilaxia das helmintoses gastrintestinais (GIROTO et al., 2008). Dentre as várias vantagens do controle biológico com fungos nematófagos está o seu sinergismo com o controle químico, o que proporciona uma maior abrangência e atuação sobre as formas infectantes presentes nas fezes, bem como sobre os helmintos adultos que estão parasitando o animal (RIBEIRO, 2003; BRAGA et al., 2008).

Entretanto, estudos com fungos entomopatogênicos têm demonstrado que os produtos químicos utilizados para o controle de pragas podem também ter efeitos

antagônicos sobre a atividade inseticida/acaricida destes fungos, quando presentes no agroecossistema (OLIVEIRA et al., 2002). A inexistência de estudos de compatibilidade de formulações químicas com fungos nematófagos, assim como a ausência de uma metodologia padronizada para este tipo de teste, estimulou a realização do presente estudo. Acredita-se que o conhecimento da compatibilidade destes produtos sobre o desenvolvimento dos fungos é essencial para os programas de controle integrado de parasitoses em animais. Desta forma, este trabalho teve por objetivos:

- adaptar a técnica de microdiluição em caldo utilizada como antifungigrama e preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para fármacos antiparasitários;
- verificar a atividade *in vitro* de fármacos preconizados para o tratamento anti-helmíntico de animais de produção, sobre os fungos utilizados no controle biológico de nematódeos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Parasitoses gastrintestinais em ruminantes

O parasitismo gastrintestinal por nematódeos é fator limitante nos sistemas de produção de animais criados a campo (JOBIM et al., 2008). As infecções por nematódeos têm importância econômica mundial na criação de animais domésticos e de produção, em função de limitar a produção de leite, reduzir o ganho de peso, além de comprometer o desempenho reprodutivo e o sistema imunológico dos hospedeiros (SOUSA et al., 2008). As consequências das helmintoses gastrintestinais dependem do número e das espécies de ovos e larvas a que o animal é exposto, assim como à quantidade de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrintestinal (WALLER, 2005).

Os animais jovens são mais suscetíveis do que os adultos, que são menos predispostos devido à imunidade estabelecida pelas infecções anteriores (AHID et al., 2008; COSTA et al., 2011). Por outro lado, a infecção dos animais é dependente de uma série de fatores que muitas vezes se inter-relacionam, nos quais se incluem os efeitos das condições climáticas, que irão determinar a taxa de contaminação da pastagem, o comportamento de pastejo dos animais, infecções prévias e o estado fisiológico dos mesmos (WALLER, 2005). Sotomaior e Soccol (1998) ressaltam que o manejo com a superlotação na criação de ruminantes contribui para o alto índice de larvas nas pastagens e é uma fonte de constante contaminação. De acordo com os trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil, na estação chuvosa ocorre maior disponibilidade de larvas infectantes nas pastagens (ARAÚJO et al., 2007). O número de helmintos presentes nos animais é maior no período seco do que no chuvoso observando, portanto, uma relação inversa entre o número de larvas infectantes nas pastagens e o número de larvas adultas nos animais.

Os programas de controle estratégico e integrado de parasitoses de ruminantes, que têm sua base no conhecimento epidemiológico em nível regional, ou mesmo

local, vêm demonstrando resultados satisfatórios e vantagens - de caráter econômico e ambiental - frente ao tratamento profilático freqüentemente utilizado pelos produtores em seus rebanhos. Assim, para a maioria das regiões, o controle estratégico dos helmintos com três dosificações no período seco é uma forma eficiente de controle das verminoses dos ruminantes, já que elimina e/ou reduz a população contaminante presente no animal, contribuindo para a redução da quantidade de larvas infectantes disponíveis para infecção e re-infecção (PEREIRA et al., 2008).

Como o aumento da produtividade do rebanho normalmente é uma meta, o controle das parasitoses torna-se um fator fundamental para o alcance dos objetivos do produtor (WALLER, 1999; LARSEN, 2002; MOLENTO, 2004). Os ruminantes podem ser parasitados por diversas espécies de nematódeos estrongilídeos, sendo os principais: *Haemonchus*; *Trichostrongylus*; *Cooperia*; *Ostertagia*; *Oesophagostomum* e *Strongyloides* (AMARANTE, 1997; URQUHART et al., 2008; VIEIRA et al., 2009).

O helminto *Haemonchus contortus* é um nematódeo cujo controle apresenta importância econômica por ser, habitualmente, o que prevalece em ruminantes, além de apresentar elevado potencial biótico e alta intensidade de infecção. Além disso, é um parasito hematófago, de grande patogenicidade, responsável por quadro clínico severo de anemia, sendo considerado o endoparasito que causa os maiores prejuízos econômicos para a cadeia produtiva (ARO et al., 2006; VIEIRA et al., 2009). A rapidez com que cepas deste parasito adquirem resistência aos fármacos antiparasitários faz com que o controle do mesmo seja cada vez mais difícil (VERÍSSIMO; CATELLI, 2008).

Outro parasito de grande importância é o nematódeo *Trichostrongylus* spp, o qual está presente em praticamente todas as criações de ruminantes. Este parasito do intestino delgado lesa as criptas da mucosa intestinal, provocando hemorragia e perda de proteínas, tendo como sintomas característicos de infecção: anorexia, diarreia enegrecida, por vezes fétida, e edema submandibular.

Espécies de *Ostertagia* também são freqüentemente encontradas em companhia de outros trichostrongilídeos que residem no intestino delgado. Esse parasitismo associado resulta na incapacidade do animal em atingir peso adequado, ocasiona inapetência, cansaço, diarreia e, nos estágios mais adiantados, hipoproteinemia com resultante edema ventral. Patologicamente produzem gastrite caracterizada por

infiltrado inflamatório crônico (linfócitos e plasmócitos), e lesões macroscópicas na mucosa do abomaso. Os ruminantes também são parasitados por espécies de *Cooperia* que causam lesões semelhantes às produzidas pelo *Trichostrongylus* spp., porém as mais evidentes se encontram no duodeno. O gênero *Strongyloides*, parasito comum do intestino delgado de animais jovens, também merecem atenção. O ciclo evolutivo desta espécie difere dos demais nematódeos, pois constitui a transição entre o ciclo de vida livre e o de vida parasitária. Sua transmissão aos hospedeiros ocorre principalmente pela penetração ativa da larva infectante na pele, ingestão de pastagens contaminadas, e pela via galactogênica. Já no intestino grosso dos ruminantes, o gênero mais patogênico encontrado é *Oesophagostomum*. As larvas desta espécie penetram nas paredes do tubo intestinal provocando reações teciduais com consequente formação de nódulos. Estes nódulos podem acarretar invaginação e estenose das alças intestinais, assim como atonia devido à rigidez das paredes do intestino. Algumas larvas, após penetrarem na parede intestinal, caem na corrente sangüínea e são levadas para vários órgãos causando nódulos no fígado, pulmões, linfonodos mesentéricos e outros. Já os adultos são menos patogênicos e não são hematófagos, alimentando-se da camada superficial da mucosa e do conteúdo intestinal (BUZZULINI, 2006; URQUHART et al., 2008).

A imunidade dos animais desempenha papel importante na resistência às verminoses, assim como fatores etários, raciais, individuais, e de condição fisiológica, interferem com a resposta do hospedeiro contra os parasitos (AMARANTE, 2008). Além disso, os esquemas de controle estratégico ou integrado preconizam práticas de manejo e de aplicação de antiparasitários que visem minimizar a pressão de seleção de parasitos resistentes aos fármacos utilizados (MOTA et al., 2003; CEZAR et al., 2011).

2.2 Fármacos antiparasitários

Diversos programas de controle antiparasitário vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos das endoparasitoses na produção extensiva de ruminantes. Entre eles, pode-se destacar o uso de compostos anti-helmínticos que têm focado a diminuição de larvas infectantes na pastagem por meio da diminuição da população de parasitos adultos nos animais (SANTOS, 2008; PEREIRA et al., 2008). Entretanto, apesar dos antiparasitários serem utilizados como uma das principais

ferramentas, seu uso possui algumas limitações, tais como: resíduos de compostos químicos em produtos animais, efeitos tóxicos em organismos não alvos no meio ambiente, e resistência anti-helmíntica (JOBIM et al., 2008). Segundo Kelly e Hall (1979) e Coles et al. (2006) a resistência pode ser definida como um aumento da habilidade das cepas de parasitos em resistir ou sobreviver às doses de um determinado princípio ativo. O uso intensivo de anti-helmínticos, a aplicação de subdoses, diagnósticos incorretos e a falta de rotatividade de bases farmacológicas, têm provocado um sério problema sanitário, que é a resistência de nematódeos aos fármacos (SOUSA et al., 2008).

A resistência de helmintos aos anti-helmínticos em ovinos e caprinos é frequente no sistema de produção, todavia, o mesmo não acontece com helmintos de bovinos, existindo um número menor de relatos. Porém, isto não é indicativo de que os parasitos dessa espécie apresentem uma menor densidade genética para a expressão da resistência, mas sim, a menor frequência de tratamentos a que são submetidos (PAIVA et al., 2001).

O uso de compostos químicos varia de acordo com a localidade e existem técnicas estratégicas de controle das verminoses para aumentar a produtividade e diminuir o nível de mortalidade dos animais. Os tratamentos periódicos com antiparasitários nos animais são, por vezes, realizados sempre nas mesmas épocas do ano, não respeitando a epidemiologia dos parasitos, e está prática, quando aliada à rápida rotação de compostos químicos, contribui para o problema da resistência parasitária (MOLENTO, 2000). A adoção de esquema estratégico de controle deve ser baseada em estudos epidemiológicos, que consistem em administrar anti-helmínticos quando os parasitos estão em menor número na pastagem, ou em épocas em que o clima proporcione as piores condições de sobrevivência dos estágios de vida livre dos mesmos. Dessa maneira evitam-se as vermifugações a curtos intervalos, fator importantíssimo no aumento da frequência de uma população de nematódeos resistentes aos anti-helmínticos (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999).

Poucos produtores realizam esquema racional de alternância de fármacos anti-helmínticos. Como consequência, o uso inadequado desses compostos seleciona parasitos que possuem a capacidade natural de resistirem a esses quimioterápicos (SOUSA, 2009). A resistência múltipla de nematódeos gastrintestinais de ruminantes às três principais classes de fármacos com ação em endoparasitos

(avermectinas/milbemicinas, benzimidazóis e imidazotiazóis) tem se tornado um problema comum ao redor do mundo (COLES et al., 2006; CEZAR et al., 2011).

Os compostos benzimidazólicos são classificados como tiazólicos (tiabendazol e cambendazol); metilcarbamatos (albendazol, fembendazol, flubendazol, luxabendazol, mebendazol, oxibendazol, oxfendazol, parbendazol); halogenados (triclambendazol) e pró-benzimidazóis (febantel, netobimim e tiofanato) (NASCENTE et al., 2007)

Os derivados dos benzimidazóis agem por contato direto com os vermes, inibindo a formação dos seus microtúbulos através do bloqueio da captação de glicose. Isto resulta na depleção de glicogênio dos parasitos e, por sua vez, na formação reduzida de trifosfato de adenosina (ATP) necessário para a sobrevivência e reprodução destes. Conseqüentemente, ocorre paralisia e morte dos vermes, que são eliminados passivamente pelas fezes. Os benzimidazóis não interferem no metabolismo da glicose no homem, porque o sistema microtubular das células desse hospedeiro é diferente daquelas dos helmintos (MOLENTO, 2004; KOROLKOLVAS; FRANÇA, 2005; BUZZULINI, 2006).

A ivermectina é um antiparasitário de amplo espectro, derivado das avermectinas. É uma lactona macrocíclica semi-sintética produzida pelo *Streptomyces avermitilis* e produz uma maior liberação de GABA (ácido gama-aminobutírico) com a conseqüente abertura do canal de cloro ao nível da membrana neuronal do parasito. O GABA liga-se mais fortemente às junções neuronais dos parasitos, interrompendo o impulso nervoso. O aumento da permeabilidade da membrana ao cloro produz ainda hiperpolarização das células musculares. Como resultado, induz à paralisia e morte do parasito (MOLENTO, 2004; KOROLKOLVAS; FRANÇA, 2005).

O closantel é um antiparasitário da classe dos salicilanilídeos halogenados e age por via oral e intramuscular. A maioria dos compostos químicos desse grupo atua desacoplando a fosforilação oxidativa no parasito (BALDANI et al., 1999).

O levamisol faz parte dos derivados dos imidotiazóis que atuam em canais de cátions mediados pela acetilcolina. É um potente inibidor estereoespecífico da fumarato redutase em vários nematódeos. Esta inibição produz contração dos helmintos, seguida por paralisia neuromuscular tônica e eliminação subsequente dos vermes (MOLENTO, 2004; KOROLKOLVAS; FRANÇA, 2005).

Os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade aos compostos anti-helmínticos enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle parasitário, que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos por

meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias, utilização de pastoreio alternado, e higienização de pastagens. A consequência direta do uso indiscriminado de vermífugos ao longo dos anos, com rápida alternância de grupos químicos sem orientação técnica, tem resultado no aumento dos custos de produção, desenvolvimento de resistência parasitária, contaminação da carne e do meio ambiente com resíduos químicos, e aumento dos índices de mortalidade no rebanho (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Esse quadro obrigou pesquisadores, técnicos de campo, produtores e a indústria farmacêutica, a buscarem outras estratégias de controle que viabilizem a produção de animais com ênfase na sustentabilidade ambiental (VIEIRA et al., 2009).

O descobrimento de novos grupos anti-helmínticos, e de outros métodos de controle parasitário, é estrategicamente necessário para a elevação da economia rural e a manutenção da saúde dos animais. As metodologias desenvolvidas mais recentemente, como a seleção genética, controle biológico e tratamento seletivo, podem ter um impacto importante no controle parasitário, aumentando a vida útil dos compostos químicos (PEREIRA et al., 2008; FALBO et al., 2009),

Alguns pesquisadores, como Santos e Charles (1995), Gronvold et al. (1996), Graminha et al. (2001) e Carvalho et al. (2007) afirmaram que a vantagem da implementação do controle biológico, está em ser um método prático, inovador, e que pode ser facilmente conjugado com os tratamentos clássicos para o controle de pragas e de parasitoses.

2.3 Controle biológico

Normalmente, o termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limiar subclínico e economicamente aceitável, a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola, além de resultar em menores efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (GRØNVOLD et al., 1996; GRAMINHA et al., 2001; GIROTTO et al., 2008). Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos, contudo, concentra suas ações sobre os estágios larvais de vida livre presentes nas fezes e pastagens, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (MOTA et al., 2003).

Com o intuito de desenvolver outros métodos para minimizar o uso de fármacos antiparasitários nas estratégias de controle dos nematódeos de ruminantes, especialmente em sistemas de produção em pastoreio contínuo, o controle biológico mediante utilização de fungos nematófagos parece ser uma realidade, oferecendo uma alternativa eficiente e segura na redução da população de ovos e larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais nas pastagens (LARSEN, 1999; ARAÚJO et al., 2007; JOBIM et al., 2008; BRAGA et al., 2008, 2010).

Os microrganismos selecionados como antagonistas naturais devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva, e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado (GIROTTO et al., 2008).

O maior problema colocado pela utilização de fungos nematófagos como agentes de controle biológico é a necessidade da sua presença nas massas fecais dos hospedeiros, para uma eficaz redução das formas infectantes neste microecossistema e, conseqüentemente, na pastagem. No entanto, sabe-se que após sua emissão, as fezes frescas de ruminantes são rapidamente colonizadas por estes fungos, sendo também comum a ingestão dos mesmos durante o pastoreio, com subsequente excreção nas fezes (LARSEN, 2000). A seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais de ruminantes está baseada na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com os fármacos tradicionais estabelecidos no mercado, e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. Deve-se atentar para que as formulações ofereçam segurança aos produtores, consumidores, animais tratados,

meio ambiente, e, finalmente, que sejam efetivas no controle do organismo alvo (MOTA et al., 2003).

O controle biológico realizado com fungos nematófagos é uma alternativa promissora que tem por finalidade o sinergismo com o controle químico (BRAGA et al., 2008). A utilização desses agentes biológicos com atuação sobre ovos e larvas de nematódeos para limpeza das pastagens tem sido intensificada nos últimos anos. Entretanto, apesar da preferência do produtor pelo controle químico, devido à sua ação imediata, o controle biológico começa a ganhar cada vez mais espaço no controle de nematódeos. Embora muitos fungos nematófagos tenham sido isolados e identificados durante o final do século XIX, ainda são raras as informações sobre suas características ecológicas, nutricionais e fisiológicas (GIROTO et al., 2008), assim como se desconhece sua suscetibilidade frente a ação de fármacos antiparasitários que possam vir a ser utilizados concomitantemente nos mesmos animais.

Deve-se lembrar que o resultado da utilização do controle biológico exige um período mais longo de observação, já que os fungos possuem um período de carência para se multiplicar e controlar satisfatoriamente os parasitos (GIROTO et al., 2008). Neste período de espera deve-se levar em conta que a utilização de produtos químicos com ação antiparasitária pode atuar desfavoravelmente na atividade dos fungos nematófagos.

Em alguns estudos, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) utilizando o controle biológico com entomopatógenos é considerado um fator importante na redução da densidade da população de insetos e de diversas pragas (NEVES et al., 2001). Porém, o sucesso de programas de controle utilizando fungos entomopatogênicos depende da sobrevivência dos conídios no meio ambiente, que pode ser alterada por fatores climáticos, biológicos ou por produtos químicos (BENZ, 1987).

Hoje em dia, técnicas *in vitro* utilizando diluições seriadas dos compostos químicos incluídas a um meio de cultura com o objetivo de verificar o efeito desses produtos sobre fungos entomopatogênicos têm evidenciado efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos (OLIVEIRA; NEVES, 2004; BARCI et al., 2009; ASI et al., 2010). Além disso, em alguns estudos, foi possível evidenciar-se diferenças de compatibilidade das formulações químicas sobre todas as fases de desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos através de técnicas *in vitro* que utiliza diluições seriadas dos compostos químicos incluídas a um meio de cultura (OLIVEIRA, et al., 2002; OLIVEIRA; NEVES, 2004; BARCI et al., 2009; ASI et al., 2010).

2.4 Fungos nematófagos

O controle biológico mediante utilização de fungos nematófagos tem se tornado uma importante estratégia para controlar os nematódeos gastrintestinais em animais de produção (ARAÚJO et al., 2004). Vários fungos nematófagos vêm sendo isolados de fezes de animais com perspectiva de serem utilizados como controladores biológicos de helmintos de bovinos, ovinos e equinos (SAUMELL et al., 1999, 2000; CASTRO et al., 2003).

Estes fungos são cosmopolitas, encontrando-se na comunidade microbiana do solo, nas pastagens, nos detritos orgânicos, e em todas as zonas onde haja matéria orgânica em decomposição, localizações propícias também ao desenvolvimento de diversas populações de nematódeos (WALLER, 1999; CARVALHO et al., 2007).

Waller (1998) considera que os fungos sejam uma importante alternativa a ser empregada em formulações biológicas para o controle de infecções parasitárias, podendo ser incluídos como forma auxiliar em programas de manejo sanitário. A forma mais prática de se fornecer esses fungos aos animais é pela administração oral. Após passarem pelo trato gastrintestinal e serem eliminados com as fezes no meio ambiente, os fungos colonizam o bolo fecal, estabelecem contato com as larvas eclodidas, produzem armadilhas e as levam à morte (GRAMINHA et al., 2005). E quanto maior a motilidade dos nematódeos no bolo fecal, maior o estímulo aos fungos para a produção de armadilhas. Além disso, essas armadilhas podem ocorrer em resposta a diversos fatores, tais como a presença de nematódeos, substâncias por eles liberadas, condições adversas de cultivo, e escassez de água e/ou nutrientes (JANSSON; NORDBRINGHERTZ, 1980).

Larsen (1999) descreve os fungos nematófagos como possuidores de características desejáveis, como alta atividade reprodutiva, ciclo de vida curto, produção de esporos dentro e fora dos animais, manutenção em fase saprofítica na ausência do hospedeiro e, principalmente, por não serem patógenos para os animais.

A resistência à passagem pelo trato gastrintestinal é uma característica importante em fungos nematófagos, quando se tem em vista a possibilidade de desenvolver formulações de uso oral que permitam o controle biológico (GRAMINHA et al., 2005). Entretanto, é imprescindível que não haja efeitos nocivos com a utilização massal e com a comercialização destes fungos (FAEDO et al., 1998).

Os fungos nematófagos são classificados como ovicidas, endoparasitos e predadores, sendo catalogadas mais de 150 espécies (BARRON, 1977; LARSEN, 1999; MOTA et al., 2003; MACIEL et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; BRAGA et al., 2007, 2008; GIROTTO et al., 2008). A maioria das espécies está classificada como fungos predadores de nematódeos, que produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. O aprisionamento à armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematódeo. Dentro do nematódeo ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos (ARAÚJO et al., 2004).

Um segundo grupo, os fungos endoparasitos são capazes de infectar os nematódeos através de esporos que, uma vez ingeridos, desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematódeo. Estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos (MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004).

No terceiro grupo de fungos, denominados ovicidas ou oportunistas, as hifas penetram a casca do ovo do helminto através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a camada de lipídios se torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo ou, ainda, a larva em desenvolvimento no seu interior (MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004).

Os fungos nematófagos predadores são os organismos antagonistas de nematódeos mais pesquisados, pois têm mostrado serem capazes de reduzir efetivamente populações de nematódeos em condições de laboratório e no campo (LARSEN, 1999). Pesquisas com essas espécies de fungos têm sido realizadas (GRAMINHA et al., 2001; MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004; MACIEL et al., 2006, 2009; BRAGA et al., 2008, 2011). Dentre esses fungos, os mais estudados são os pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium*, que têm ação comprovada sobre nematódeos gastrintestinais de ruminantes, e são promissores candidatos a serem utilizados no controle biológico desses animais (LARSEN, 1999; ALVES et al., 2003; CASTRO et al., 2003; BRAGA et al., 2007,

2008). Para que o controle biológico reduza as larvas infectantes nas pastagens é necessário que os clamidósporos resistam à passagem pelo trato gastrointestinal do animal e, nas fezes, sejam capazes de atacar as formas larvais dos parasitos, reduzindo assim a população larval *in situ* e nas pastagens (SILVA et al., 2009).

A espécie *Duddingtonia flagrans* (Figuras 1A e 1B), considerada a mais promissora devido à abundância de clamidósporos, é a mais estudada no controle das helmintoses dos ruminantes (MOTA et al., 2003; PARAUD et al., 2005, 2011; BRAGA et al., 2009). Possui ação predatória, formando um tipo de armadilha que se caracteriza por um sistema de hifas adesivas simples. Além disso, produz dois tipos de esporos - conídios e clamidósporos - intercalados por hifas maduras que, no ambiente, permitem seu uso como controlador biológico (BRAGA et al., 2008).

O fungo *D. flagrans* aprisiona os helmintos às redes tridimensionais e, logo após, segue-se a penetração das hifas na cutícula do nematódeo, onde ocorre o crescimento destas hifas e a digestão dos conteúdos internos. Devido ao seu mecanismo de ação, vários trabalhos têm demonstrado que *D. flagrans* é bastante eficaz para reduzir o número de larvas na matéria fecal e, como consequência, na pastagem (CARVALHO et al., 2007; JOBIM et al., 2008; BRAGA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011).

Grønvold et al. (1993) e Larsen et al. (1992, 1994, 1995) demonstraram a facilidade da administração do fungo *D. flagrans* em ruminantes e equinos, pela resistência e viabilidade após passagem deste fungo pelo tubo digestivo destes animais, que se deve ao tipo especial de esporos e de clamidósporos, os quais são muito resistentes aos sucos digestivos e possuem elevada taxa de viabilidade após eliminação fecal. Experimentos com vários isolados australianos identificaram a espécie *D. flagrans* como mais eficiente na passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos (FAEDO et al., 1998). Jobim et al. (2008) demonstraram que esse fungo tem capacidade nematofágica significativa com capacidade de redução de larvas na pastagem e de ovos por grama de fezes.



Figura 1A: Cultura de dez dias de *Duddingtonia flagrans* em PDA (Potato Dextrose Agar), 25°C.
Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPEl)

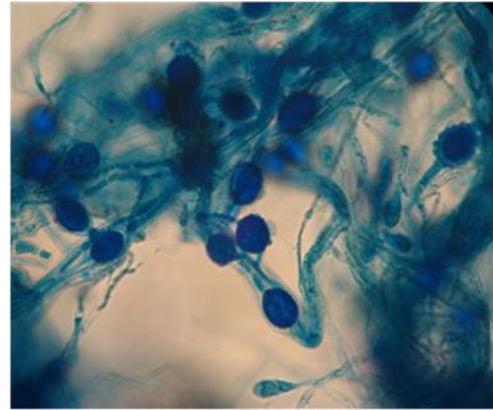


Figura 1B: Clamidósporos de *Duddingtonia flagrans*. Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x).
Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPEl)

O gênero *Arthrobotrys* reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos. As espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos de até três septos, com formato ovóide, proliferando-se na extremidade dos conidióforos. Há abundância na formação de conidióforos e no processo de conidiogênese, iniciado de forma simpodial (ZHANG et al. 1996).

A espécie *Arthrobotrys oligospora* (Figuras 2A e 2B) é considerada um importante e efetivo agente nematófago que tem sido encontrado em diferentes ambientes, podendo crescer em substratos disponíveis do solo (CARDOSO et al., 2009). Sua atividade predadora é estimulada pela presença de nematódeos ou substâncias derivadas destes (ARAÚJO, 2001). Produz um extenso sistema de hifas, ao longo das quais são produzidas organelas capazes de capturar nematódeos vivos (ARAÚJO et al., 2004). O crescimento rápido e a produção abundante de micélio são dois fatores importantes para a disseminação e sobrevivência desses fungos em condições ambientais, embora o crescimento micelial não esteja relacionado com a capacidade de um isolado em predação de nematódeos (JAFFEE, 2004).

Waller et al. (1994) e Graminha et al. (2005) mostraram que conídios de *Arthrobotrys* spp sobreviveram à passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos, sem perda de capacidade predatória sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Em outro trabalho, a passagem e recuperação de conídios desses fungos nas fezes de bovinos demonstrou que conídios e micélio também foram capazes de atravessar o trato gastrointestinal desses animais e manter a atividade predatória sobre larvas infectantes de *Haemonchus placei*, reduzindo a população deste nematódeo, em comparação ao grupo controle (ARAÚJO et al., 1996, 1999). A administração de

conídios de *A. oligospora* às fezes de equino, mostrou ser capaz de reduzir a população de larvas infectantes de ciatostomíneos (CHARLES et al., 1995).

As conclusões destes estudos em condições de laboratório foram favoráveis à utilização de fungos como controladores biológicos de larvas de parasitos de animais domésticos (Larsen, 1999).

Resultados semelhantes foram encontrados por Amarante e Barbosa (1995), em experimento onde verificaram elevada freqüência de *Haemonchus* e *Trichostrongylus* em ovinos e demonstraram que o tratamento destes animais, tanto com conídios de *Arthrobotrys* spp microencapsulados quanto *in natura*, favoreceu a redução dos parasitos.



Figura 2A: Cultura de dez dias de *Arthrobotrys oligospora* em PDA (Potato Dextrose Agar), 25°C.

Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPel)

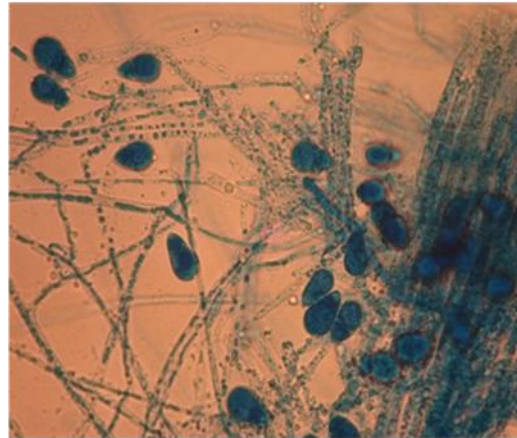


Figura 2B: Macroconídios característicos de *Arthrobotrys oligospora*.

Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x).

Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPel)

As espécies de fungos ovicidas têm sido utilizadas com sucesso no controle de ovos de helmintos (BRAGA et al., 2008). A maioria dos estudos sobre a atividade ovicida de fungos nematófagos foi realizada em fitonematódeos, e até mesmo algumas estirpes têm sido utilizadas como agentes de controle biológico desses parasitos. Estas investigações não evoluíram da mesma forma em relação aos nematódeos parasitos de animais e/ou do homem que são transmitidos pelo contato com solo contaminado com ovos (geohelmintíases) (GORTARI et al., 2007).

O fungo *Paecilomyces* spp., que possui ação ovicida, caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematódeos, destruindo o embrião e podendo exercer forte pressão na

capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e, posteriormente, mortas. Frequentemente tem sido isolado a partir de diferentes hospedeiros ou de substratos provenientes de várias localidades, com distribuição cosmopolita e maior frequência em solos agricultáveis (SANTIAGO et al., 2006).

A espécie *Paecilomyces lilacinus* (Figuras 3A e 3B) é um dos fungos com ação ovicida mais utilizado no controle biológico de nematódeos. Alguns trabalhos demonstram essa atividade ovicida sobre ovos de alguns parasitos como: *Toxocara canis* (ARAÚJO et al., 1995; BASUALDO et al., 2000; GORTARI et al., 2007), *Taenia saginata* (BRAGA et al., 2008^a; ARAUJO et al., 2010) e sobre cápsulas ovíferas de *Dipylidium caninum* (ARAUJO et al., 2009), o que indica a viabilidade de efetuar seu emprego como potencial controlador biológico desses parasitos.

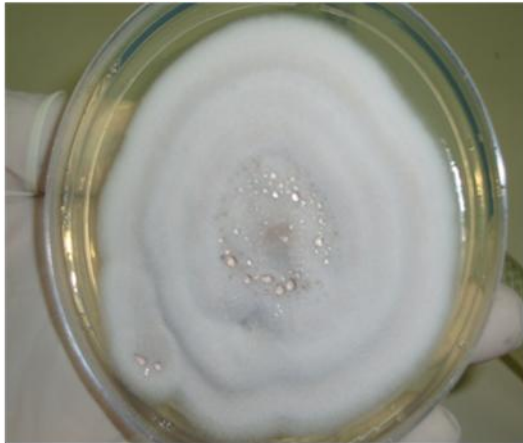


Figura 3A: Cultura de dez dias de *Paecilomyces lilacinus* em PDA (Potato Dextrose Agar), 25°C.
Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPEl)

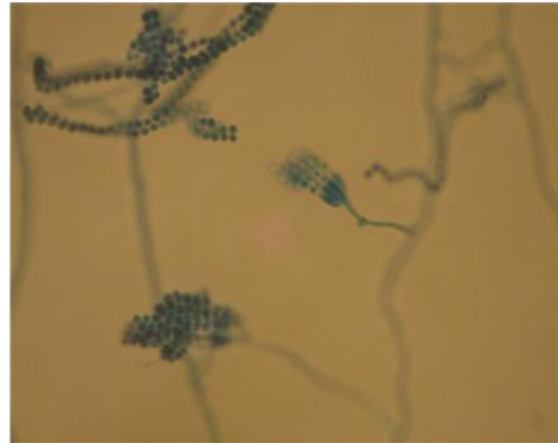


Figura 3B: Microconídeos característicos de *Paecilomyces lilacinus*. Exame direto com lactofenol azul de algodão (40x).
Fonte: Juliana Nunes Vieira – Lab. Micologia (UFPEl)

O desenvolvimento de formulações fúngicas para uso no controle biológico é um dos principais passos para a produção comercial destes microrganismos. Deste modo, pesquisas que visam produzir material fúngico de maneira economicamente viável são extremamente necessárias, e constituem um passo importante para viabilização da produção comercial de fungos nematófagos.

Em muitos estudos estes fungos têm sido produzidos em substratos sólidos como grãos de cereais, e esse substrato colonizado é fornecido aos animais. Recentemente, formulações à base de alginato de sódio têm sido avaliadas experimentalmente, demonstrando bons resultados em condições laboratoriais e a campo (ARAÚJO; SAMPAIO, 2000; ALVES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004). O

fornecimento de material fúngico incorporado em blocos de suplementos minerais tem sido estudado na Austrália. Formulações minerais contendo clamidósporos do fungo *D. flagrans* têm obtido resultados positivos (WALLER; FAEDO,1996). Segundo Graminha (2001), é essencial que os órgãos financiadores apoiem as pesquisas nessa área, pois muitos aspectos básicos da biologia, da epidemiologia e da interação patógeno – hospedeiro, necessitam ser estudados.

3 ARTIGO

Susceptibility of nematophagous fungi against antiparasitic drugs

Submetido a revista veterinary Parasitology (normas no anexo)

Abstract

The rapid development of resistance to anthelmintics has shown the limited efficiency of this method in the suppression of endoparasitoses in ruminants, and has furthered research in alternative control methods. The use of chemicals in animal anthelmintic treatment, in association with menatophagous fungi used for biological control, is a strategy that has proven to be effective in reducing the nematode population density of farm animals. This study aims to verify the *in vitro* susceptibility of the nematophagous fungi *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii* and *Paecilomyces variotii* against the antiparasitic drugs albendazole, thiabendazole, ivermectin, levamisole and closantel by using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). MICs ranged between 4 and 0,031 μ g/mL for albendazole, thiabendazole and ivermectin, between 0,937 and 0,117 μ g/mL for levamisole, and between 0,625 and 0,034 for closantel. The results obtained showed that all antiparasitic drugs tested had an *in vitro* inhibitory effect on nematophagous fungi, being able to jeopardize the fungus action as a biological control bioagent.

Key words: biological control, susceptibility test, antiparasitic, nematophagous fungi.

1. Introduction

Gastrointestinal helminths are one of the most prominent factors that interfere with the full development of the livestock industry (Mota et al., 2003), causing relevant damage, as they can lead to a delay in animal development, management overspending, reduced herd productivity, increased economic losses, and even death (Araújo et al., 2004). The widespread use of anthelmintics has restricted the use of most chemicals, as evidenced by the occurrence of resistance, food residues and ecotoxic action. At first parasitic resistance became a worldwide problem in small ruminant raising – especially sheep – by the excessive use of anthelmintic treatments. However, this resistance has also been widely reported in cattle (Cezar et al., 2008). These drawbacks have spurred the search for alternative control methods which can complement / reduce enthelmintic use in endoparasitosis control strategies in pasture-based production systems (Saumell et al., 2008). In that context, the biological control of nematophagous fungi appears as a promising strategy which can give satisfactory results (Alves et al., 2003; Araújo et al., 2004, 2006; Bragat et al., 2008; Ferreira et al., 2011).

Several natural nematode antagonists, among which bacteria, viruses, protozoa, beetles, mites and fungi, have been described as potential biological controllers; nematophagous fungi, however, have shown encouraging results against geohelminths in contaminated environments. Fungi of the genera *Arthrobotrys* spp., *Duddingtonia* spp. and *Monacrosporium* spp. have proved to be effective both in the laboratory and in the field as nematode biological control agents (Mota et al., 2003; Braga et al., 2011). These fungi behave as natural antagonists, and can capture, or even kill, the parasite, and are classified as endoparasites, predators or opportunistic (Braga et al., 2007, 2008). The advantage of combining biological control of nematophagous fungi with chemical control is that the former acts on the infective forms present in the stools, whereas the latter acts on gastrointestinal nematodes that parasite the animal.

The combined use of incompatible pesticides in Integrated Pest Management (IPM) may inhibit the development and reproduction of entomopathogenic fungi, thus affecting the IPM control strategy (Neves et al., 2001; Alizadeh et al., 2007). The impact of the application of these pesticides on entomopathogens may vary according to pathogen species and strain, chemical nature of the product, and concentration used. These products may act by inhibiting the vegetative growth, conidiogenesis and sporulation of microorganisms, causing genetic mutations which in turn may lead to a decrease in virulence of a particular pest (Tanzani et al., 2002). Experiments have been conducted to verify the effect of chemicals on entomopathogenic fungi and have shown the influence of these chemicals on fungus viability (Barci et al., 2009). The amount of research on nematophagous fungi to control parasitic diseases in animals is remarkable (Gronvold et al., 1996; Graminha et al., 2001, 2005; Araújo et al., 2006; Cezar et al., 2008; Saumell et al., 2008; Braga et al., 2011; Ferreira et al., 2011); however, none of these pieces of research has evaluated the compatibility of these microorganisms with frequently used antiparasitic formulations.

The lack of compatibility studies, as well as the lack of a standardized method for this test, has prompted the development of this research, aiming to check the *in vitro* activity of drugs prescribed for ruminant anthelmintic treatment on the viability of fungi used in parasite biological control.

2. Materials and Methods

2.1. Sample acquisition

The drugs albendazole, thiabendazole, ivermectin, levamisole and closantel were commercially purchased from their manufacturers, and the fungi *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii* and *Paecilomyces variotii* were kindly provided by CENARGEN - Centro

Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (National Research Center for Genetic Resources and Biotechnology) – EMBRAPA.

The fungi were kept in tubes containing PDA agar at room temperature.

2.2. *Susceptibility testing*

The susceptibility test was performed by the broth micro dilution technique (BMD), according to reference document M38-A2 (CLSI, 2008) adapted for antiparasitic drug testing.

Ten successive dilutions (1:2) were prepared from the stock solution for each drug. Each antiparasitic was diluted in RPMI-1640 broth at concentrations ranging from 4 to 0,0078 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for abendazole, thiabendazole and ivermectin, from 1,875 to 0,003 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for levamisole and from 2,5 to 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for closantel. One hundred μL aliquots for each concentration of antiparasitic drug were dispensed into corresponding well microplates; a 100 μL inoculum solution prepared from the conidial suspension of the fungus in sterile saline and adjusted to a 68 to 70% transmittance ($0,4 \times 10^4$ to 5×10^4 UFC/ mL) (CLSI, 2008) was added to each well. Negative control consisted of 200 μL RPMI-1640 broth and positive control consisted of 100 μL RPMI-1640 broth and 100 μL of inoculum. The plates were incubated for 48 h at 32°C. All tests were performed in duplicate with three repetitions.

2.3. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Reading*

For test reading, fungus growth in the wells referring to the different concentrations tested was visually compared with its growth in the positive control well. The smallest concentration able to inhibit fungus growth in relation to the positive control well was identified as the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the drug for that sample.

3. Results

The MICs of the different drugs tested against nematophagous fungi are shown in Table 1.

The results show that, excluding the species *D. flagrans* (more susceptible to albendazole – MIC 0.031 µg/mL) and *A. oligospora* (more susceptible to thiabendazole – MIC 0.125 µg/mL), the other fungi tested evidenced greater susceptibility to antiparasitic drugs levamisole and closantel with MICs ranging from 0.937 to 0.039 µg/mL. Now front of the antiparasitic ivermectin, albendazole and thiabendazole were observed MICs ranging from 4.0 to 0.031 µg/mL.

Table 1 – Minimal Inhibitory Concentrations (µg/mL) of five antiparasitic drugs against six nematophagous fungi

Antiparasitic drugs	ivermectin	albendazole	thiabendazole	levamisole	closantel
Nemathofagous fungi					
<i>A. oligospora</i>	0.5	4.0	0.125	0.234	0.312
<i>D. flagrans</i>	0.5	0.031	0.062	0.117	0.039
<i>P. fumosoroseus</i>	2.0	2.0	2.0	0.68	0.312
<i>P. lilacinus</i>	2.0	2.0	2.0	0.937	0.312
<i>P. marquandii</i>	2.0	4.0	2.0	0.234	0.625
<i>P. variotii</i>	2.0	2.0	2.0	0.468	0.625

4. Discussion

The combined use of chemical and biological controls may be a viable strategy for livestock, reducing costs, resistance, toxicity and management, in addition to reducing residues

both in products of animal origin and in the environment. (Soares and Monteiro, 2011). However, studies aiming at an evaluation of the alterations in different nematophagous fungus development variables caused by the combined use of these fungi with antiparasitic drugs are not available, even though this is a practice that should interest farmers seeking an effective endoparasitosis control in ruminants.

To the best of our knowledge this study is pioneer in the research of nematophagous fungus susceptibility to the anthelmintics frequently used in the chemical control of parasitoses in livestock. The results obtained showed that the fungi tested may be inhibited by ivermectin, albendazole, thiabendazole, levamisole and closantel.

Studies have shown that chemicals used in agriculture may have antagonistic, synergistic, or no effect, on the insecticide / acaricide activity of entomopathogens in the agro ecosystem (Oliveira et al., 2002). Experiments have been conducted to detect pesticide effect on entomopathogenic fungi (Neves et al., 2001; Oliveira and Neves, 2004; Alizadeh et al., 2007). Borges and Vila Nova (2011) mention the occurrence of physiological alterations with loss of entomopathogenic fungus performance on arthropods after the use of chemicals.

According to Hirose et al. (2001), the use of chemicals which are incompatible with fungi can inhibit the development and reproduction of these microorganisms, thus affecting an effective biological control. This incompatibility has been well-characterized by studies which demonstrated that associations with organophosphates are not recommended for tick control in the field, once all treatments performed that contained these active components had a toxic effect on *Beauveria bassania*. These observations are in agreement with those reported by Oliveira and Neves (2004) who, upon analyzing the compatibility of the acaricides with *B. bassania* used on farmland, found that formulations that belong to the organophosphorus and organotin chemical groups drastically affected conidium germination, as well as the vegetative growth and sporulation of isolates of this entomopathogen. Conversely, the most compatible

formulations with the fungus were those belonging to the avermectin and pyrethroid chemical groups (Oliveira and Neves, 2004). In the present study, ivermectin had an inhibitory effect on all nematophagous fungi tested. Ivermectin use, which is employed both as an anthelmintic and against tick in ruminants, is becoming increasingly common; however, the compatibility of these chemicals with other biological practices must be known so as to avoid loss of control efficiency.

Studies by Asi et al. (2010) to evaluate the influence of some insecticides on mycelial growth, and conidial (spore) germination of *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus* showed that all insecticides inhibited fungus mycelial growth and conidial germination significantly. A similar effect against the antiparasitics used in this study was observed for *P. fumosoroseus*, on which the chemicals levamisole and closantel showed the most significant inhibitory effect.

The susceptibility of the fungal isolate *D. flagrans* to benzimidazoles (albendazole and thiabendazole), with MICs ranging from 0,031 to 0,062 μ g/mL, respectively – differently from the other fungal isolates evaluated - is worthy to mention. It is believed that this result is due to *D. flagrans* susceptibility to benzimidazols, connected to its (?) mechanism of action. Studies using a greater number of isolates are being conducted to evaluate such findings. The most relevant result of these studies seems to be the likely interference of these drugs, commonly used in helminth control, on the biological control with *D. flagrans*, one of the most commonly used and effective predatory fungi against endoparasites (Braga et al., 2011; Sagués et al., 2011). In addition to these results, the great susceptibility of all evaluated isolates against closantel and levamisole is worthy to mention. As demonstrated in the present study, compatibility testing of microorganisms used in helminth biological control with chemicals is of great importance.

In vitro test techniques that evaluate compatibility of chemicals with entomopathogenic fungi usually make use of different serial dilutions of the chemicals, which are added to a culture medium, making the method both laborious and costly (Oliveira and Neves, 2004; Barci et al., 2009; Asi et al., 2010). This study, however, used the broth dilution method based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documentation which standardizes susceptibility tests of some fungi to specific antifungals. The technique adapted to parasitic drugs proved to be easy to use, fast, reproducible and safe, and can be routinely used in compatibility tests to anthelmintics. Pereira et al. (2010) used this technique for *D. flagrans* susceptibility tests against antifungals, and obtained good results.

According to Moino Jr and Alves (1998), *in vitro* investigations have the advantage of fully exposing the pathogen to the chemical action, which is not the case under field conditions, where several factors are a barrier to this exposition. Thus, once the safety of a particular product is confirmed in the laboratory, there should be no doubt on its selectivity in the field. On the other hand, the toxicity of a product to an *in vitro* microorganism is not always related to its high field toxicity, but rather to the possibility of such damage occurring.

Finally, it should be taken into account that the experiments in this study were conducted *in vitro*, and that the results obtained may not be repeated in *in vivo* studies. For this purpose, research aiming to evaluate drug toxicity under such conditions is needed.

5. Conclusions

By the methodology used in the present study, it could be concluded that all tested drugs showed inhibitory effect against the fungi used for biological control. Consequently, the results obtained allow previewing that the knowledge of chemical compatibility on fungus development is essential for the establishment of integrated control programs of animal parasitoses.

Acknowledgement:

The authors would like to thank CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil) for financial support.

Conflict of interest:

The authors state no conflict of interest.

References

Asi, M.R., Bashir, M.H., Afzal, M., Ashfaq, M., Sahi, S.T., 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. Pak. J. Bot. 42, 4207-4214.

Alizadeh, A., Samih, M.A., Khezri, M., Riseh, R.S., 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with Several Pesticides. Int. J. Agric. Biol. 9, 31–34.

Alves, P.H., Araújo, J.V., Guimarães, M.P., Assis, R.C.L., Sarti, P., Campos, A.K., 2003. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55, 568-573.

Araújo, J.V., Assis, R.C.L., P.H. Alves, P.H., Campos, A.K., Gandra, J.R., 2004. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56, 467-471.

Araújo, J.V., Freitas, B.W., Vieira, T.C., Campos, A.K., 2006. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 15, 76-79.

Barci, L.A.G., Wenzel, I.M., Almeida, J.E.M., Nogueira, A.H.C., Prado, A.P., 2009. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com

carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 18, supl. 1, 63-68.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Campos, A.K., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Tavela, A.O., Maciel, A.S., 2007. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40, 356-358.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Araújo, J.M., Tavela, A.O., 2008. Observação *in vitro* da ação dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. Parasitol. Latinoam. 63, 40-45.

Braga, F.R., Araújo, J.M., Silva, A.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., Tavela, A.O., Silva, M.E., Tavela, A.O., 2011. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 389-391.

Borges, L.R., Vila Nova, M.X., 2011. Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas – uma revisão. Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais 7, 179-190.

Cezar, A.S., Catto, J.B., Bianchin, I., 2008. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. Ciência Rural 38, 2083-2091.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard Document M38-A2.

Wayne, P.A.: CLSI.

Ferreira, S.R., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araujo, J.M., Fernandes, F.M., 2011. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of *Oesophagostomum* spp. after passing through gastrointestinal tract of pigs. Trop. Anim. Health Prod. 43,1589-1593.

Graminha, E.B.N, Maia, A.S., Santos, J.M. Cândido, R.C., Silva, G.S.; Costa, A.J., 2001. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. Semina: Ci. Agrárias 22, 11-16.

Graminha, E.B.N.; Monteiro, A.C.; Silva, H.C., Oliveira, G.P., Costa, A.J., 2005. Controle de nematódeos parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. Pesq. agropec. bras. 40, 927-933.

Gronvold, J., Henriksen, S.Aa, Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., 1996. Biological control - Aspects of biological control, with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. Veterinary Parasitology 64, 47-64.

Hirose, E., Neves, P.M.O.J., Zequi, J.A.C., Martins, L.H., Peralta, C.H., Moino Jr., A., 2001. Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology 44, 419 – 423.

Moino Jr, A., Alves, S.B., 1998. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no Comportamento de Limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Brasil 27, 611-619.

Mota, M.A., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. Pesq. Vet. Bras. 23, 93-100.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

Neves, P.M.O.J, Hirose, E., Tchujo, P.T., Moino JR, A., 2001. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. Neotrop. entomol. 30, 263-268.

Oliveira, R.C., Neves, P.M.O.J., Guzzo, E.C., Alves, V.S., 2002. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com agroquímicos. Semina: Ciências Agrárias 23, 211-216.

Oliveira, R.C., Neves, P.M.O.J., 2004. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. Neotropical Entomology. 33, 353-358.

Pereira, P. de L., Santurio, J.M., Mahl, D.L., Jesus, F.P.K., Pilotto, M.B., Alves, S.H., 2011. Padronização de uma técnica de avaliação antifúngica para *Duddingtonia flagrans*. Anais 25° JAI.

Sagüés, M.F., Fusé, L.A., Fernández, A.S., Iglesias, L.E., Moreno, F.C., Saumell, C.A., 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Res.* 109,707–713.

Saumell, C., Fusé, L., Iglesias, L., Fernández, S., Fiel, C., 2008. Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematófagos en el control biológico de tricostrongilídeos de rumiantes. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 89, 45-54.

Soares, F.B., Monteiro, A.C., 2011. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arq. Inst. Biol.* 78, 385-391.

Tanzini, M.R., Alves, S.B., Setten, A., 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. *Arq. Inst. Biol.*, 69, 65-69.

4. CONCLUSÕES

A utilização da metodologia de microdiluição em caldo baseada no documento do CLSI adaptada aos fármacos antiparasitários, mostrou ser de fácil execução, rápida, reprodutível e segura, podendo ser utilizada como rotina em testes de compatibilidade aos anti-helmínticos;

Nas condições em que o estudo foi realizado, todos os fungos testados apresentaram diferentes graus de suscetibilidade aos antiparasitários avaliados;

Os isolados fúngicos de *Paecilomyces* spp. apresentaram maior suscetibilidade aos antiparasitários levamisol e closantel. Já *D. flagrans* foi mais suscetível ao albendazol e *A. oligospora* ao tiabendazol.

Os resultados ora apresentados permitem antever que o conhecimento da compatibilidade dos produtos químicos sobre o desenvolvimento dos fungos, é essencial para os programas de controle integrado de parasitoses em animais. Todavia, pesquisas avaliando a atuação dos fármacos frente aos fungos nematófagos *in vivo* são necessárias.

5. REFERÊNCIAS

AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B., COSTA, V. M. M.; SOARES, H. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 212-218, 2008.

ALVES, P. H.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; ASSIS, R. C. L.; SARTI, P.; CAMPOS, A. K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 568-573, 2003.

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output in sheep. **Veterinária e Zootecnia**, v.7, p.127-133, 1995.

AMARANTE, A. F. T.; BAGNOLA, J. R.; AMARANTE, M. R. V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.89-104, 1997.

AMARANTE, A. F. T. Fatores que afetam a resistência dos ovinos à verminose. in: VERÍSSIMO, C. J. **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2008.

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

ARAÚJO, J. V.; NETO, A. P.; AZEVEDO, M. H. F. Screening parasiticematodetrapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p.543-552, 1996.

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

ARAÚJO, J. V.; SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through gastrointestinal tract of calves on alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p.55-59, 2000.

ARAÚJO, J. V. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.10, n.1, p.7-11, 2001.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle Biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl. 1, p. 165-170, 2004.

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

ARAÚJO, J. M.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O. Activity of nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Dipylidium caninum* egg capsules. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 154-158, 2009.

ARAÚJO, J. M.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; BENJAMIN, L. A. The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 165-169, 2010.

ARO, D. T.; POLIZER, K. A.; BELUT, D. S.; De ALMEIDA, C. R.; Do AMARAL, L. C.; NEVES, M. F.; RODRIGUES, R. Verminose Ovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 3, n. 7, p. 1-6, 2006.

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; AFZAL, M.; ASHFAQ, M.; SAHI, S. T. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. **Pakistan Journal of Botany**, 42, 4207-4214, 2010.

BALDANI, L. A.; SOUSA, R. V.; MIGUEL, A. G. Farmacologia dos principais antiparasitários de uso na Medicina Veterinária. Ministério da Educação e do Desporto. **Universidade Federal de Lavras**. Departamento de Medicina Veterinária. Lavras, 1999.

BARCI, L. A. G.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA A. H. C.; PRADO, A. P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 63-68, 2009.

BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal Parasitology**. v. 29, n. 1, p. 41-47, 1999.

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

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

BENZ, G. Environment. In: FUXA, T.; TANADA, Y. (Eds.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. Cap 4, 177- 214.

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

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O. Observação *in vitro* da ação dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 63, n. 1-2-3-4, p. 40 - 45, 2008.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 686-688, 2008^a.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K. Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 83-85, 2009.

BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. V.; FRASSY, L. N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 588-590, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M.; MELO, A. L. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 389-391, 2011.

BUZZULINI, Carolina. **Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina 1% em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais**, 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia (Produção Animal) – Faculdade de ciências

agrárias e veterinárias, Universidade estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

CARDOSO, E. R.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 267-272, 2009.

CARVALHO, L. M. M.; GILLESPIE, A. T.; SERRA, P. M.; BERNARDO, F. A.; FARRIM, A. P.; FAZENDEIRO, I. M. Efficacy of the nematofagous fungi *Duddingtonia flagrans* in the biological control of horse strongylosis in the Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. (563-564), p. 233-247, 2007.

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

CEZAR, A. S.; RIBAS, H. O.; PIVOTO, F. L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Combinação de drogas antiparasitárias como uma alternativa para o controle de nematódeos gastrintestinais multiresistentes em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 12, p. 151-157, 2011.

CHARLES, T. P.; RODRIGUES, M. L. A.; SANTOS, C. P. Redução do número de larvas de Cyathostominae em fezes de eqüinos tratadas com conídios de *Arthrobotrys oligospora*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 1, p. 87-89, 1995.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.136, p. 167–185, 2006.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2011.

FAEDO, M.; BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. (1-2), p.129-135, 1998.

FALBO, M. K.; SANDINI, I. E.; ISHIY, H. M.; FÁVARO, J. L.; SANTOS, C. E. dos; BASTOS, S.; RODRIGHERI, D.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 881-886, 2009.

FERREIRA, S. R.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; FERNANDES, F. M. In vitro predatory activity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of *Oesophagostomum* spp. after passing through gastrointestinal tract of pigs. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, n 8, p. 1589-1593, 2011.

GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematódeos parasitas: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

GORTARI, C.; CAZAU, C.; HOURS, R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 24-28, 2007.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J. Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitas de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.1, p. 11-16, 2001.

GRAMINHA, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Controle de nematódeos parasitas gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 9, p. 927-933, 2005.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. **Journal of Helminthology**, v. 67, n. 1, p. 31-36, 1993.

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

JAFFEE, B. A. Wood, nematodes, and the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1171-1178, 2004.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: Attraction, induction of trap formation and capture. **Nematology**, v. 26, n. 4, p. 383-389, 1980.

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

KELLY, J. D.; HALL, C. A. Anthelmintic resistance in nematodes. **History, present status in australia, genetic background and methods for field diagnostic**, 1979. New South Wales Veterinary. Proceedings..., p. 1-13.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. Fármacos do trato gastrintestinal. In: **Dicionário Terapêutico Guanabara**, 12^a Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.10.1-10.35.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v.66, n. 2, p.137-141, 1992.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 275-281, 1994.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; ZORN, A.; WEDØ, E. Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. (3-4), p. 315-320, 1995.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 139-146, 1999.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi predacious micro fungi. **Parasitology**, v. 120, n. 7, p. 121-131, 2000.

LARSEN, M. Biological control in a global perspective – a review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Final proceedings... 2002**. 104 p.

MACIEL, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K. Viabilidade sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 182-187, 2006.

MACIEL, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in

different conidial concentrations. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3-4, p. 239-247, 2009.

MOLENTO, M. B. Guia FAMACHA para diagnóstico clínico de parasitoses em pequenos ruminantes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, p.175-178, 2000.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl. 1, p. 82-87, 2004.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V.; Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

NASCENTE, P. S.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Tiabendazol em Veterinária: Anti-helmíntico e Antifúngico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 14-19, 2007.

NEVES, P. M. O. J; HIROSE, E.; TCHUJO, P. T.; MOINO, J. R. A. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 263-268, 2001.

OLIVEIRA, R. C.; NEVES, P. M. O. J.; GUZZO, E. C.; ALVES, V. S. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com agroquímicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 211-216, 2002.

OLIVEIRA, R.C.; NEVES, P. M. O. J. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. *Neotropical Entomology*. v. 33, p. 353-358, 2004.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUÑA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 20, n. 120, p. 29-32, 2001.

PARAUD, C.; HOSTE, H.; LEFRILEUX, Y.; POMMARET, A.; PAOLINI, V.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Veterinary Research**, v, 36, n. 2, p. 157-166, 2005.

PARAUD, C.; LORRAIN, R.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: n evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 86, n. 1, p. 95-103, 2011.

PEREIRA, R. H. M. A.; AHID, S. M. M.; BEZERRA, A. C. D. S.; SOARES, H. S.; FONSECA, Z. A. A. S. Diagnóstico da resistência dos nematóides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.1, p.16-19, 2008.

RIBEIRO, R. R. **Atividade predatória sobre larvas de Trichostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero Monacrosporium após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos.** 2003. 44f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

SANTOS, C. P.; CHARLES, T. P. Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivo de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.2, p.123-128, 1995.

SANTOS, C. P. Sistemas de produção integrados por ovinos, bovinos ou eqüinos, e o controle parasitário. **in: VERÍSSIMO, C. J. Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes.** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2008.

SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; SANTOS, C. DE P.; ROQUE, M. V. C. Nematophagous fungi in fresh feces of cattle in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 217-220, 1999.

SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; SANTOS, C. DE P. Nematophagous fungi in sheep faeces in Minas Gerais, Brazil. **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 1005 -1008, 2000.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; GRESSLER, L. T.; ROSA, L. D.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Técnicas parasitológicas adaptadas para quantificação de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* em fezes ovinas e na pastagem. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 373-378, 2009.

SOTOMAIOR, C. S.; SOCCOL, V. T. Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 51-55, 1998.

SOUSA, A. P.; RAMOS C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. P.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 38. n. 5, p. 1363-1367, 2008.

SOUSA, R. V. R. **Estudo da eficácia de extratos botânicos sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos do sertão Paraibano,** 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Patos. Sul, Brasil.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS F. W. Helminthologia Veterinária. In: URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS F. W. **Parasitologia Veterinária**, 2^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1-120.

VERÍSSIMO, C. J.; CATELLI, L.; Sistemas de produção integrados por ovinos, bovinos ou eqüinos, e o controle parasitário. in: VERÍSSIMO, C. J. **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2008. 127 p.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. (3-4), p. 99-103, 1999.

VIEIRA, L. S.; LÔBO, R. N. V.; CAVALCANTE, A. C. R.; NEVES, M. R. M.; NAVARRO, A. M. C.; BENVENUTI, C. L.; ZAROS, L. G. Panorama mundial dos métodos de controle de endoparasitoses. **4º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte. Feira Nacional do Agronegócio da Caprino-Ovinocultura de Corte**. João Pessoa – Paraíba – Brasil, 22p, 2009.

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

WALLER, P. J.; FAEDO, M. The prospect for biological control of the freeliving stages of nematode parasite of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. (8-9), p.915-925, 1996.

WALLER, P. J. Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. In: Biological control of gastrointestinal nematodes ruminants using predacious fungi, **19 FAO Animal Production and Health**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 11-14, 1998.

WALLER, P. J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 155-164, 1999.

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

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L. Nematophagous species of *Monacrosporium* from China. **Mycological Research**, v. 100, n. 3, p. 274-276, 1996.

ANEXO

Guide for Authors



Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

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

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

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

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

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

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor (unsolicited reviews will not usually be accepted), but the position is currently vacant (following Dr Borgsteede's retirement) and a new Editor will be appointed shortly.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

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

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

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

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

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

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:

→ http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

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

italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

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

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

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

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

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

Abstract

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

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

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

5. SI units should be used.

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

Abstracts

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

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be

kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:

➤ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

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

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

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

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

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

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

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

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

c. *For books*

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

d. *For multi-author books*

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

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

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

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

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research

colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)

- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Veterinary Parasitology* has no page charges**

[↑ Top of Page](#)