



# Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*

Predatory activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Arthrotrys robusta* on *Strongyloides stercoralis* infective larvae

Fabio Ribeiro Braga<sup>1</sup>, André Ricardo e Silva<sup>1</sup>, Juliana Milani Araújo<sup>1</sup>, Rogério Oliva Carvalho<sup>1</sup>, Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup> e Luiza Neme Frassy<sup>1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** *Strongyloides stercoralis* é um nematoide que infecta grande parte da população mundial. **Métodos:** O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrotrys robusta* (I-31) sobre larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Strongyloides stercoralis* em condições laboratoriais no meio ágar-água 2%. **Resultados:** Ao final do experimento, os percentuais de redução de L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* observados foram de: 83,7% (AC001); 75,5% (NF34) e 73,2% (I-31). **Conclusões:** Os fungos nematófagos foram capazes de capturar e destruir *in vitro* as L<sub>3</sub>, podendo ser utilizados como controladores biológicos de *Strongyloides stercoralis*.

**Palavras-chaves:** Fungos nematófagos. *Strongyloides stercoralis*. Controle biológico.

### ABSTRACT

**Introduction:** *Strongyloides stercoralis* is a nematode that infects much of the population worldwide. **Methods:** This study aimed to compare the ability of predatory nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Arthrotrys robusta* (I-31) on infective larvae (L<sub>3</sub>) of *Strongyloides stercoralis* in laboratory conditions on 2% water-agar. **Results:** At the end of the experiment, the percentage reductions in *Strongyloides stercoralis* L3 were 83.7% (AC001), 75.5% (NF34) and 73.2% (I-31). **Conclusions:** The nematophagous fungi were able to capture and destroy the L3 *in vitro* and may be used as biological controls of *Strongyloides stercoralis*.

**Key-words:** Nematophagous fungi. *Strongyloides stercoralis*. Biological control.

Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são infectadas por geohelmintos através do solo, sugerindo, portanto que a contaminação ambiental é um importante indicador de risco da população humana de contrair estas infecções<sup>1</sup>. Por outro lado, os estudos sobre parasitismo em animais de estimação vêm despertando crescente interesse, frente à associação restrita e íntima entre o homem e os animais e sua consequência em saúde pública<sup>2</sup>.

O *Strongyloides stercoralis* é um nematoide do gênero *Strongyloides*, de elevada prevalência em todo o mundo. A doença, estrogiloidíase,

produzida por esse verme é uma das mais importantes helmintoses intestinais em países tropicais, sendo o homem, seu principal reservatório, e a principal fonte de infecção<sup>3</sup>. Contudo, nos cães sua prevalência também é alta<sup>4</sup>. Além disso, o parasita do cão é morfológicamente e biologicamente indistinguível do humano<sup>5</sup>.

A infecção por *Strongyloides stercoralis* ocorre pela penetração das larvas infectantes (L<sub>3</sub>) através da pele humana intacta ou animal ou por ingestão acidental destas larvas. As larvas rabditóides eliminadas nas fezes do indivíduo parasitado podem seguir dois ciclos: direto (partenogenético) e o indireto (sexuado) ou de vida livre. Ambos, entretanto, darão origem a larvas filaróides infectantes. Após a oviposição, os ovos, já no solo e em condições favoráveis de temperatura e umidade, tornam-se embrionados; em seguida, eclodem, pondo em liberdade as larvas rabditóides (L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>). As fases dos ciclos que se passam no solo exigem certas condições, tais como: solo arenoso, umidade alta, temperatura entre 25°C e 30°C e ausência de luz solar direta<sup>5</sup>.

A estrogiloidíase, como as demais helmintoses gastrintestinais, sendo doença devida à poluição do solo com fezes contaminadas, pode ser facilmente evitada pelo tratamento adequado do material fecal. No entanto, segundo Chandler<sup>6</sup> tal processo à primeira vista dos mais simples, constitui um dos problemas sanitários de maior importância. Sendo assim, medidas alternativas de controle são bem vindas, e dentre elas, está o uso de fungos nematófagos, presentes no meio ambiente como uma alternativa viável e, cuja ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate dos ovos e das larvas infectantes dos geohelmintos<sup>7</sup>.

Fungos predadores de nematoides é certamente o grupo mais estudado e que apresenta o maior potencial na destruição das formas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de animais e humanos<sup>8</sup>. As espécies de fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrotrys robusta* são identificadas como predadoras e têm sido estudadas como agentes controladores biológicos de nematoides potencialmente zoonóticos<sup>9</sup>.

O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade predatória *in vitro*, dos fungos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrotrys robusta* sobre L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis*.

Foram utilizados três isolados de fungos nematófagos, um de *Duddingtonia flagrans* (AC001), um de *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e um de *Arthrotrys robusta* (I-31). Esses isolados são oriundos de solo do Brasil, na localidade de Viçosa na zona da mata

1. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

**Endereço para correspondência:** Dr. Fabio Ribeiro Braga. Deptº de Veterinária/UFV. Av. Ph Rolfes s/n, 36570-000 Viçosa, MG.

Tel: 55 31 3899-1458.

e-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

Recebido para publicação em 09/12/2009

Aceito em 07/04/2010

de Minas Gerais e são provenientes do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa. Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% e no escuro durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9cm diâmetro contendo 20mL de ágar-água 2% (AA 2%) onde foram acrescidos de 1mL de água destilada contendo 1.000 larvas de *Panagrellus* sp, nematoide de vida livre, diariamente durante um período de 21 dias para indução da formação de conídios fúngicos. Quando se observou o completo desenvolvimento fúngico, 5mL de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri, sendo que os conídios e fragmentos miceliais foram removidos segundo a técnica descrita por Araújo e cols<sup>10</sup>.

Coproculturas realizadas com fezes de um cão, naturalmente, infectado com *Strongyloides stercoralis* foram colocadas em aparelho de Baermann modificado para a recuperação das L<sub>3</sub><sup>11</sup>. A seguir, realizou-se o teste de predação em superfície de placas de Petri de 9cm de diâmetro preenchidas com AA 2% de acordo com técnica modificada por Mota e cols<sup>12</sup>. Foram formados quatro grupos, três grupos tratados com os fungos e um grupo controle (sem fungos). Nas placas de Petri, foram vertidos 0,1mL de solução contendo 5 x 10<sup>3</sup> conídios por ml (500 conídios) de cada fungo AC001, NF34, I-31 e 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* em cada grupo tratado. O grupo controle recebeu apenas 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* na superfície das placas de Petri. Foram realizadas seis repetições para cada grupo. Durante sete dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4mm de diâmetro em cada placa dos grupos tratados e controle foram observados em microscópio óptico em objetiva de 10x, contando-se o número de L<sub>3</sub> não predadas em cada um. Ao final de sete dias, foram recuperadas as L<sub>3</sub> não predadas do conteúdo das placas de Petri através do aparelho de Baermann com água a 42°C. A média de L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* recuperadas foi calculada. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1% de probabilidade.

A eficiência de predação de L<sub>3</sub> em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, o percentual de redução da média de L<sub>3</sub> foi calculado de acordo com seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas do controle} - \text{Médias de L}_3 \text{ recuperadas do tratamento}}{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas do controle}} \times 100$$

Os isolados dos fungos predadores testados, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrotrys robusta* (I-31) foram capazes de predação das L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* no teste *in vitro*. Comparando a captura e destruição das L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* nas placas de Petri dos grupos tratados com os fungos (AC001, NF34 e I-31), durante o experimento, foi observado que não houve diferença (p>0,01) na sua ação (Tabela 1). Contudo, diferença (p<0,01) foi observada entre as médias de L<sub>3</sub> de

*Strongyloides stercoralis* não predadas por campo de 4mm de diâmetro das placas do grupo controle em relação aos grupos tratados com fungos durante todo o experimento.

Os percentuais de redução de L<sub>3</sub> observados no experimento para os fungos foram de: 83,7% (AC001); 75,5% (NF34) e 73,2% (I-31). Por outro lado, a presença das L<sub>3</sub> de *Strongyloides stercoralis* nas placas de Petri contendo AA2% foi essencial para a formação das armadilhas pelos isolados fúngicos, uma vez que esse meio de cultura é pobre em nutrientes. Nas placas do grupo controle, não foi observada presença de fungos nematófagos durante o experimento. A comprovação da predação foi verificada pelas médias de L<sub>3</sub> recuperadas por meio do método de Baermann no sétimo dia (Figura 1).

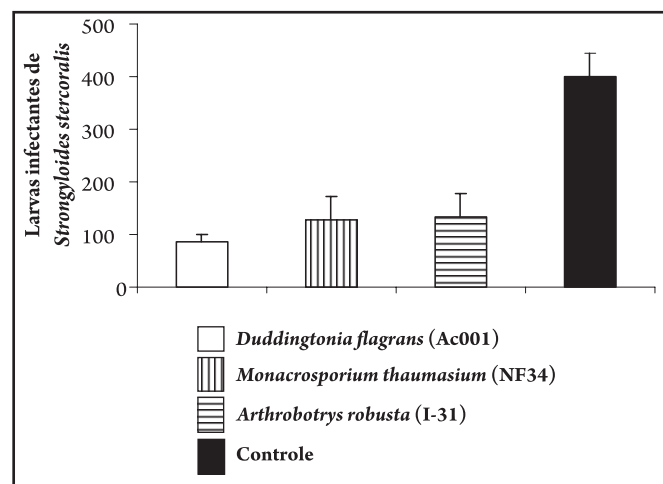


FIGURA 1 - Número médio de larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis* não predadas recuperadas em meio ágar-água 2% pelo método de Baermann no sétimo dia dos tratamentos após interação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *Arthrotrys robusta* (I-31) e controle. Barra representa o desvio padrão.

Dentre os helmintos com potencial zoonótico, destacam-se os do gênero *Ancylostoma*, *Toxocara* e *Strongyloides*<sup>5,9</sup>. Este último, além de sua importância médico-veterinária, requer atenção especial e investigação, uma vez que, infecta o homem causando perturbações gastrointestinais e anemia<sup>5</sup>. De acordo com Scowden e cols<sup>13</sup>, a estrogiloidíase é um grave e importante problema médico-social. Esses autores relatam que em indivíduos imunodeprimidos muitas vezes essa doença pode levar a morte, devido a sua facilidade de transmissão, a cronicidade e a autoinfestação. No Brasil, essa doença tem grande importância em saúde pública, cujas taxas de infecção variam de acordo com a região estudada. Por outro lado, as condições sanitárias e de higiene do indivíduo são diretamente proporcionais à infecção por *Strongyloides stercoralis*, uma vez que, seu desenvolvimento ocorre no meio ambiente<sup>5</sup>.

TABELA 1 - Média diária e desvios padrão de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) não predadas de *Strongyloides stercoralis* durante o período de sete dias nos tratamentos com os fungos e no controle.

Fungos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
AC001	2,1 <sup>A</sup> ± 1,2	2,4 <sup>A</sup> ± 1,7	1,2 <sup>A</sup> ± 1,6	1,3 <sup>A,B</sup> ± 1,3	1,1 <sup>A</sup> ± 1,3	0,4 <sup>A</sup> ± 0,6	0,2 <sup>A</sup> ± 0,5
NF34	2,6 <sup>A</sup> ± 1,4	1,9 <sup>A</sup> ± 1,7	1,3 <sup>A</sup> ± 1,0	1,0 <sup>A</sup> ± 1,0	1,2 <sup>A</sup> ± 1,1	0,3 <sup>A</sup> ± 0,5	0,1 <sup>A</sup> ± 0,4
I-31	2,5 <sup>A</sup> ± 1,2	2,3 <sup>A</sup> ± 1,6	1,2 <sup>A</sup> ± 1,2	2,1 <sup>B</sup> ± 1,5	2,0 <sup>A</sup> ± 1,9	0,7 <sup>A</sup> ± 0,9	1,1 <sup>B</sup> ± 1,3
Controle	5,6 <sup>B</sup> ± 2,7	8,2 <sup>B</sup> ± 3,9	8,3 <sup>B</sup> ± 4,3	5,1 <sup>C</sup> ± 2,8	5,8 <sup>B</sup> ± 4,2	4,8 <sup>B</sup> ± 3,1	7,0 <sup>C</sup> ± 3,2

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente (p>0,01) - Teste de Tukey.

AC001: *Duddingtonia flagrans*, NF34: *Monacrosporium thaumasium*, I-31: *Arthrotrys robusta*.

Nesse contexto, sugere-se a empregabilidade dos fungos nematófagos *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrotrys*, cuja capacidade predatória sobre  $L_3$  de nematoides parasitas gastrintestinais com potencial zoonótico tem sido comprovada<sup>7-9</sup>. Todavia, a capacidade predatória destes fungos nunca tinha sido testada sobre de  $L_3$  de *Strongyloides stercoralis*, sendo este, o primeiro relato da destruição de  $L_3$  deste nematoide. De acordo com Carvalho e cols<sup>9</sup>, estes fungos não são exigentes em relação a sua nutrição. Eren e Pramer<sup>14</sup> mencionam que o fornecimento periódico de nematoides aos fungos em meio de cultura pobre em nutrientes reduziria o seu crescimento saprófita. Dessa forma, no presente trabalho foi utilizado apenas o meio AA2%, um meio pobre em nutrientes, com a intenção de reduzir o crescimento saprófita dos isolados fúngicos utilizados proporcionando apenas as  $L_3$  de *Strongyloides stercoralis* como fonte de nutrição. Ainda, segundo estes autores, quanto maior a mobilidade dos nematoides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas. Este fato foi observado no presente trabalho, uma vez que, a formação de armadilhas e predação das  $L_3$  pelos isolados fúngicos foram visualizadas logo na primeira observação, ocorrida após 24h de interação.

Maciel e cols<sup>15</sup> registraram que em meio de cultura AA2% o fungo *Arthrotrys robusta* demonstrou maior atividade predatória sobre  $L_3$  de *Ancylostoma* sp, em relação aos demais fungos testados *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium*. Contudo, em trabalho recente Braga e cols<sup>8</sup> registraram que em meio de cultura AA2% o fungo *Duddingtonia flagrans* demonstrou maior atividade predatória (80,3%) sobre  $L_1$  de *Angiostrongylus vasorum* em relação aos demais isolados utilizados *Monacrosporium thaumasium* (74,5%) e *Arthrotrys robusta* (71,8%). Estes resultados estão de acordo com o presente trabalho, uma vez que, a maior atividade predatória *in vitro* observada ao final do experimento sobre  $L_3$  de *Strongyloides stercoralis* foi para o isolado fúngico de *Duddingtonia flagrans* (AC001) em meio AA2%. No entanto, faz-se necessário à realização de mais pesquisas que possam demonstrar a interação destes e de outros fungos nematófagos sobre  $L_3$  de nematoides gastrintestinais com potencial zoonótico ajudando na sua diminuição ambiental e, por conseguinte, nas infecções.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam trabalhos anteriores da eficiência dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrotrys robusta* (I-31) no controle de larvas de nematoides potencialmente zoonóticas.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## SUPORTE FINANCEIRO

CAPES, FINEP/pro - equipamentos, CNPq e FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

- Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world? J Parasitol 1999; 85:397-403.
- Vasconcellos MC, Barros JSL, Oliveira CS. Parasitas gastrintestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. Rev Saude Publica 2006; 40:321-323.
- Ribeiro LC, Rodrigues Jr ENA, Silva MD, Takiuchi A, Fontes CJF. Púrpura em paciente com estrogiloidíase disseminada. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38:255-257.
- Lemos LB, Qu Z, Laucirica R, Fred HL. Hyperinfection syndrome in strongyloidiasis: report of two cases. Ann Diagn Pathol 2003; 7:87-94.
- Costa-Cruz JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, editores. Parasitologia Humana. 11<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro; 2005. p. 275-284.
- Chandler RN. Introduction to human Parasitology. 4<sup>th</sup> ed. Nova York and London; 1955.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, et al. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamyosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:356-358.
- Braga FR, Carvalho RO, Araujo JM, Silva AR, Araújo JV, Lima WS, et al. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. J Helminthol 2009; 83:303-308.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. Predatory activity of nematophagous fungi on *Ancylostoma* ssp. infective larvae: evaluation *in vitro* and after passing through gastrointestinal tract of dogs. J Helminthol 2009; 83:231-236.
- Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS. Antagonistic effect of predacious *Arthrotrys fungi* on infective *Haemonchus placei* larvae. J Helminthol 1993; 67:136-138.
- Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. Parasitol Res 2003; 89:89-93.
- Mota MA, Campos AK, Araújo JV. Avaliação da capacidade predatória dos fungos *Arthrotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* sobre nematóides gastrintestinais parasitos de bovinos, submetidos a diferentes métodos de preservação. Rev Bras Parasitol Vet 2002; 11:13-17.
- Scowden EB, Schaffner W, Stone WJ. Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. Medicine 1978; 57:527-524.
- Eren J, Pramer D. The most probable number of nematode-trapping fungi in soil. Soil Sci 1965; 99:285.
- Maciel AS, Araujo JV, Campos AK. Viability of nematophagous fungi *Arthrotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* after sporulation in different culture means. Rev Bras Parasitol Vet 2006; 15:182-187.