

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**USO COMBINADO DO FUNGO *DUDDINGTONIA FLAGRANS*,
DIMETILSULFÓXIDO E IVERMECTINA NO CONTROLE *IN VIVO* DO
NEMATOIDE *Rhabditis* spp EM BOVINOS DA RAÇA GIR**

SAMILLA ALVES SOBRAL

VILA VELHA
FEVEREIRO/ 2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**USO COMBINADO DO FUNGO *DUDDINGTONIA FLAGRANS*,
DIMETILSULFÓXIDO E IVERMECTINA NO CONTROLE *IN VIVO* DO
NEMATOIDE *Rhabditis* spp EM BOVINOS DA RAÇA GIR**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal, para a
obtenção do grau de Mestra em
Ciência Animal.

SAMILLA ALVES SOBRAL

VILA VELHA
FEVEREIRO/ 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A474u Sobral, Samilla Alves.
 Uso combinado do fungo *Duddingtonia flagrans*, dimetilsulfóxido e ivermectina no controle *in vivo* do nematoide *Rhabditis* spp em bovinos da raça Gir. / Samilla Alves Sobral. – 2022.
 58 f.: il.

 Orientador: Fabio Ribeiro Braga.
 Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2022.
 Inclui bibliografias.

 1. Medicina veterinária. 2. Pragas - Controle biológico.
 3. Bovinos. 4. Fungos. I. Braga, Fabio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

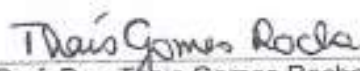
SAMILLA ALVES SOBRAL

USO COMBINADO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans*,
DIMETILSULFÓXIDO E IVERMECTINA NO CONTROLE *IN VIVO* DO
NEMATOIDE *Rhabditis* spp., EM BOVINOS DA RAÇA GIR

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha,
como pré-requisito do
Programa de Pós-
graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciência
Animal.

Aprovado (a) em 22 de fevereiro de 2022,

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Thaís Gomes Rocha (Universidade Vila Velha)



Prof. Dr. Filipe Elias de Freitas Soares (Universidade Federal de Lavras)



Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga (Universidade Vila Velha)

Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e à Nossa Senhora por todas as bênçãos obtidas, sempre me guiando e protegendo, colocando no meu caminho pessoas maravilhosas que me apoiaram e me ajudaram.

Serei eternamente grata ao professor, orientador e amigo Fábio Ribeiro Braga, que sempre acreditou em mim, me direcionou, compartilhou seus conhecimentos, incentivou o meu crescimento profissional e pessoal e todo o carinho, durante todos os anos de orientação.

A Carolina, Fábio Senna, Emy Hiura, Otávio minha gratidão mais profunda pelos conselhos, apoio e ajuda ao longo do projeto.

Aos amigos Luanderson, Natalia, Isadora, Larissa, Gabriely, Viviani, Bárbara, Joyce e Lauany por todo carinho e incentivo.

Além disso, tenho uma dívida enorme com os excelentes professores, pelo conhecimento compartilhado, paciência e zelo.

Enfim, minha eterna gratidão aos meus pais Luciano e Sandra, todo amor, apoio e confiança. À minha irmã Luana e ao meu cunhado Elvis, todo carinho.

E é claro, ao meu namorado Rômulo, cujo o amor, carinho, amizade, paciência e ajuda durante esses anos foram imprescindíveis para que eu conseguisse concluir minha jornada com êxito.

À todos minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. Introdução.....	4
2. Revisão de literatura.....	5
2.1. <i>Rhabditis</i> spp.....	5
2.2. Fungos nematófagos.....	6
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos.....	8
4. Material e Métodos.....	9
4.1. Comitê de Ética.....	9
4.2. Coleta de <i>Rhabditis</i> spp.....	9
4.3. Compostos Químicos e Fungo Nematófago.....	9
4.4. Ensaio Experimental.....	10
4.5. Análise Estatística.....	10
5. Resultados.....	11
6. Discussão.....	12
7. Conclusão.....	14
8. Referências Bibliográficas.....	15

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Médias e percentuais de redução dos nematoides <i>Rhabditis</i> spp., recuperados nos grupos de animais tratados (G1 a G6) ao longo dos dias D7, D14 e D21 em relação aos seus grupos controles no D0.....	10
---	----

RESUMO

SOBRAL, SAMILLA ALVES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2022.
Uso combinado do fungo *Duddingtonia flagrans*, dimetilsulfóxido e ivermectina no controle *in vivo* do nematoide *Rhabditis* spp em bovinos da raça Gir.
Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

A otite parasitária causada pelo nematoide *Rhabditis* spp., é um grave problema sanitário no Brasil, por não possuir um controle eficaz. Estudos *in vitro* associando o controle biológico e o controle químico como método alternativo demonstraram resultados promissores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso combinado do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001), dimetilsulfóxido 10% e Ivermectina 1,87% no controle *in vivo* de *Rhabditis* spp., em bovinos da raça Gir. Para isso, 18 animais foram alocados em 6 grupos experimentais com 3 animais por grupo: G1 (Ivermectina 1,87%); G2 (dimetilsulfóxido 10%); G3 (AC001); G4 (Ivermectina 1,87% + dimetilsulfóxido 10%); G5 (Ivermectina 1,87% + AC001); G6 (dimetilsulfóxido 10% + AC001). Ao final do período experimental, os resultados demonstraram que houve redução percentual na recuperação dos nematoides nos grupos tratados em relação ao bruto controle ($P < 0,01$). G1: 47% (D7) e 32,4% (D21); G2: 69,6% (D7) e 41,4% (D21); G3: 39,7% (D7 e D21); G4: 36,4% (D7) e 33,6% (D21); G5: 36% (D7) e 32,6% (D21) e G6 25,4%(D7) e 38,4% (D21). Nos grupos tratados não houve diferença ($p > 0,01$) ao longo do período experimental. Concluiu-se que a combinação de compostos químicos e o fungo AC001 foram eficientes no controle *in vivo* de *Rhabditis* spp. Contudo, novos delineamentos com outras formulações químicas e biológicas são necessários a fim de se observar o real efeito na saúde animal e diminuição da otite parasitária.

Palavras-chave: *Rhabditis* spp.; otite parasitária; controle biológico; Espírito Santo.

ABSTRACT

SOBRAL, SAMILLA ALVES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2022.
Combined use of the fungus *Duddingtonia flagrans*, dimethylsulfoxide and ivermectin in the *in vivo* control of the nematode *Rhabditis* spp in Gyr cattle.
Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Parasitic otitis caused by the nematode *Rhabditis* spp. is a serious health problem in Brazil, as it does not have an effective control. *In vitro* studies associating biological control and chemical control as an alternative method showed promising results. The objective of the present work was to evaluate the combined use of the fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001), 10% dimethylsulfoxide and 1.87% Ivermectin in the *in vivo* control of *Rhabditis* spp., in Gyr cattle. For this, 18 animals were allocated into 6 experimental groups with 3 animals per group: G1 (Ivermectin 1.87%); G2 (10% dimethylsulfoxide); G3 (AC001); G4 (1.87% Ivermectin + 10% dimethylsulfoxide); G5 (1.87% Ivermectin + AC001); G6 (10% dimethylsulfoxide + AC001). At the end of the experimental period, the results showed that there was a percentage reduction in the recovery of nematodes in the treated groups in relation to the crude control ($P < 0.01$). G1: 47% (D7) and 32.4% (D21); G2: 69.6% (D7) and 41.4% (D21); G3: 39.7% (D7 and D21); G4: 36.4% (D7) and 33.6% (D21); G5: 36% (D7) and 32.6% (D21) and G6 25.4% (D7) and 38.4% (D21). In the treated groups there was no difference ($p > 0.01$) throughout the experimental period. It was concluded that the combination of chemical compounds and the fungus AC001 were efficient in the *in vivo* control of *Rhabditis* spp. However, new designs with other chemical and biological formulations are necessary in order to observe the real effect on animal health and reduction of parasitic otitis.

Keywords: *Rhabditis* spp.; parasitic otitis; biological control; Espírito Santo.

1. INTRODUÇÃO

O nematoide *Rhabditis* sp., causa a otite parasitária em bovinos, principalmente nas raças Gir, Indubrasil e também em seus mestiços (Leite et al., 2013). Dessa forma, chama-se atenção para o padrão racial que ocupa um lugar de destaque entre os criadores por ser ideal para cruzamentos, entregando ao produtor animais de dupla aptidão. Lamenta-se, entretanto, que o melhoramento genético inicial visou características raciais, especialmente cabeça e orelha, o que conseqüentemente resultou em um pavilhão auricular propício ao desenvolvimento de parasitas, ácaros e infecções auditivas (Vieira et al., 2001).

A otite parasitária geralmente afeta ambas as orelhas e causa secreção purulenta abundante com grande quantidade de parasitas. Apesar da doença ser causada pelo *Rhabditis* sp., pouco se sabe sobre o seu ciclo evolutivo, porém, um dos fatores relevantes que contribuem para a transmissão do parasita é a presença de dípteros (moscas), que quando semeados em ágar-sangue e mantidos em temperatura ambiente, as espécies do gênero *Rhabditis* completaram o ciclo biológico de 7 a 8 dias (Vieira et al., 1998; Vieira et al., 2001; Verocai et al., 2007).

Especificamente em relação aos tratamentos empregados na otite parasitária, existem muitos fármacos que têm sido utilizados, contudo, os resultados são insatisfatórios e a recidiva das infecções é um problema rotineiro nos animais (Verocai et al. 2007; Barbosa et al., 2016). Por outro lado, o problema das nematodioses como um todo, no Brasil e no mundo é muito grave e cada vez mais tem sido muito estudado, principalmente na utilização de alternativas que possam ser sinérgicas ao controle de fármacos anti-helmínticos (Braga & Araújo, 2014). Esta premissa, tem sido há muito tempo estudada e no Brasil uma formulação para o controle de nematoides parasitos gastrintestinais tem sido recentemente utilizada (Braga et al., 2020). Recentemente, Sobral et al. (2019) demonstraram *in vitro* a eficácia do emprego de fungos nematófagos dentre eles do *Duddingtonia flagrans* no controle de *Rhabditis* sp.,

Em outro trabalho recente, Ferraz et al. (2019) registram que o uso de dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% em conjunto com os fungos nematófagos foram eficientes *in vitro* na destruição de *Rhabditis* sp., representando uma premissa futura para o uso combinado de fungos nematófagos dentro e compostos químicos. Contudo, naquele trabalho os autores propuseram que no futuro delineamentos a

campo fossem realizados. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o uso combinado do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001), dimetilsulfóxido 10% e Ivermectina 1,87% no controle *in vivo* de *Rhabditis* spp., em bovinos da raça Gir.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Rhabditis* spp.

A bovinocultura leiteira é uma das cadeias produtivas mais importantes do agronegócio brasileiro e, dentre as doenças mais comuns que afetam a produção dos animais estão as doenças infecciosas, bacterianas e verminoses. A otite parasitária pode ser causada tanto por helmintos nematoides quanto por ácaros, podendo ainda estar associada a bactérias (Bossi et al., 2015).

O agente etiológico que pertence ao gênero *Rhabditis* é o principal responsável pela otite em bovinos. Os nematoides *Rhabditis* spp., são microbívoros, saprófitos, que vivem em matéria orgânica em decomposição, possuem o tamanho pequeno, as fêmeas têm aproximadamente de 1,5 mm e os machos 1,2 mm (Martins, 1985). Ainda pouco se sabe sobre o ciclo evolutivo completo desse parasita, entretanto, estudos mostraram que no Brasil, as espécies identificadas demoram de 7 a 8 dias para completar o ciclo biológico em condições laboratoriais (Vieira et al., 1998).

A otite parasitária acomete bovinos da raça Gir, tendo relatos da raça Indubrasil, em razão das características raciais que propiciam a retenção de cerúmen e, quando associada à presença de pelos, secreções orgânicas, calor e umidade favorecem o desenvolvimento de parasitas como o *Rhabditis* spp. e infecções auditivas secundárias (Campos et al., 2009; Leite et al., 2013).

A doença pode acometer ambas as orelhas, podendo evoluir para síndrome vestibular periférica ou central, com lesão do nervo facial e em estágios mais avançados, o quadro pode ser irreversível, com lesões neurais fatais (Souza et al., 2008), o que dificulta a eficácia dos protocolos de tratamento (Duarte et al., 2004).

A ocorrência de *Rhabditis* spp., tem sido observada em várias regiões do Brasil (Leite et al., 2012; Barbosa et al., 2016; Sobral et al., 2019), sendo relatado também em outros países como Colômbia, Quênia e Tanzânia, onde o clima é quente e úmido

(Msolla et al., 1993; Matandala et al., 2002; Cardona et al., 2012). No estado do Espírito Santo, Sobral et al. (2019) registraram a ocorrência deste nematoide em animais com diagnóstico de otite parasitária. O diagnóstico é realizado através de inspeções do conduto auditivo efetuando limpezas da secreção com o uso de swab ou mesmo zaragatas em animais com otite clínica, e por lavagens do conduto auditivo externo dos animais com otite subclínica (Barbosa et al., 2016).

Em relação ao tratamento, o mesmo, já foi descrito por alguns autores, porém, os protocolos realizados apresentaram baixa eficácia no controle, não proporcionando efeito desejado, como o utilizado por Barbosa et al. (2016), que dividiram os animais em dois grupos de tratamento, com resultados ineficazes, no primeiro foi aplicado nos 5 mL de ivermectina 1% no pavilhão auricular e no segundo, os autores realizaram lavagens com álcool éter 1:1 do conduto auditivo externo dos animais, contendo sulfato de cobre a 2%. Os resultados vão de encontro aos obtidos por Vieira et al. (2009), em que a utilização de ivermectina 0,05%, na dose de 500 µg/kg e de administrado sulfóxido de albendazol 6%, na dose de 6 mg/kg não mostraram-se eficientes.

2.2. Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos são organismos presentes no solo que atuam nas fases pré-parasitárias de helmintos parasitos e, a utilização desses organismos tem sido explorada como uma forma de controle das helmintoses (Braga et al., 2009). O controle biológico realizado com estes fungos tem sido bastante estudado visando o combate dos nematoides parasitos gastrintestinais, no Brasil e no mundo, sendo assim, o grupo vem proporcionando redução das fases pré-parasitárias dos nematoides tanto em condições laboratoriais quanto a campo (Silveira et al., 2017; Silva et al., 2017).

Os fungos predadores induzem a produção de hifas e estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, botões e redes tridimensionais adesivas na presença de um helminto, ou seja, quanto maior a motilidade, maior o estímulo para a produção de armadilhas pelo fungo para capturar o nematoide por adesão. As hifas são usadas como armadilhas para capturar o parasita por adesão. Após, a produção das armadilhas os fungos penetram nas L3 e na cutícula do nematoide ocorre o

crescimento das hifas e a digestão do conteúdo interno (Mota et al., 2003; Braga & Araújo, 2014).

A ação dos fungos predadores também ocorre por um conjunto enzimático, sendo fundamental para perfurar e degradar a cutícula das larvas infectantes rica em quitina. Estes fungos são cosmopolitas, são encontrados no solo, pastagens e em todas as zonas onde haja matéria orgânica em decomposição (de Carvalho et al., 2007). Os fungos dos gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* estão dentro da classificação dos fungos predadores. Eles são utilizados no controle biológico de nematoides parasitas de ruminantes domésticos e se mostram eficazes no controle dos helmintos (Vilela et al., 2012). Fungos nematófagos vem sendo estudados e aplicados como meio de controle em nematoides de animais domésticos, com resultados promissores nos últimos anos (Tavela et al., 2013).

A espécie *D. flagrans* preda as larvas por meio de hifas adesivas, e o gênero é caracterizado por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos (Mota et al., 2003).

O uso de fungos nematófagos vem sendo discutido como alternativa no controle do *Rhabditis* spp. Estudos *in vitro* mostraram atividade nematicida sobre as larvas do nematoide com um percentual de redução de 82,8% e 39%, dos fungos *D. flagrans* e *M. thaumasium*, respectivamente (Sobral et al., 2019). Ademais, a associação de dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% com conídios dos fungos citados anteriormente apresentou resultados promissores *in vitro*, sendo uma alternativa futura para utilização *in vivo* do protocolo (Ferraz et al., 2019). Todavia, em relação controle biológico de *Rhabditis* spp., ainda existe uma escassez e carência de trabalhos, sendo o presente trabalho uma importante ferramenta auxiliar para o futuro controle da otite parasitária.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a utilização do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) isolado e em associação com a Ivermectina, dimetilsulfóxido no controle *in vivo* do nematoide *Rhabditis* spp.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o percentual de redução do nematoide *Rhabditis* spp em bovinos naturalmente infestados mediante o tratamento dos grupos G1 (ivermectina 1,87%); G2 (dimetilsulfóxido 10%); G3 (AC001); G4 (ivermectina 1,87% + dimetilsulfóxido 10%); G5 (ivermectina 1,87% + AC001); G6 (dimetildulfóxido 10% + AC001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética Animal

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Vila Velha sob o processo número 608-2021, seguindo as normas de conduta para o uso de animais na pesquisa sob supervisão do médico veterinário responsável Fábio Ribeiro Braga, portador do CRMV 552-ES.

4.2. Coleta de *Rhabditis* spp.

O presente trabalho foi realizado em uma propriedade localizada no município de Anchieta, distrito de Jabaquara, no estado do Espírito Santo, Brasil. A propriedade possui um rebanho de 200 bovinos das raças Gir e Girolando. Para a coleta de dados e realização do tratamento dos animais, foram realizadas visitas técnicas à propriedade entre os meses de setembro a novembro de 2021.

Os animais foram contidos em tronco de contenção e feita a imobilização da cabeça com o auxílio de cordas, para realização da inspeção do conduto auditivo e posterior coleta das amostras, seguindo a metodologia de Barbosa et al. (2016). Para realização da técnica do lavado do conduto auditivo dos animais, foram utilizados 50 mL de solução fisiológica em uma seringa de 60 mL, a solução foi aplicada no conduto auditivo externo, nas orelhas esquerda e direita dos animais, respectivamente, o material foi coletado em uma bandeja inox estéril e acondicionados em tubos tipo Falcon de 50 mL.

A seguir as amostras foram acondicionadas e encaminhadas para análise laboratorial. Os tubos contendo o material foram centrifugados e o sobrenadante descartado. 10 µL do sedimento foram pipetados e realizado a contagem das larvas de *Rhabditis* spp em microscópio óptico na objetiva de 10x.

4.3. Compostos químicos e fungo nematófago

Foram utilizados no experimento: dimetilsulfóxido 10% (Vetnil, Brasil), óleo mineral 100% (União Química, Brasil) e ivermectina 1,87% (Eqvalan® Pasta - Merial, Brasil). Os compostos foram adquiridos do comércio local para realização do estudo.

Utilizou-se o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001). Esse fungo é proveniente de solo brasileiro e foi fornecido pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa. Após o crescimento, o isolado foi transferido para placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar 2% (BDA2%). Os fungos foram deixados por 7 dias para induzir a formação de conídios fúngicos. Quando observado crescimento fúngico, foi adicionado 5 mL de água destilada a cada placa de Petri, e os conídios e fragmentos miceliais foram removidos de acordo com a técnica descrita por Araújo e Guimarães (2002).

4.4. Ensaio experimental

No presente trabalho, foram montados 6 grupos de animais alocados aleatoriamente: Grupo 1 (G1) - Ivermectina (Eqvalan® Pasta) 500 µg/animal, via tópica no pavilhão auricular. Grupo 2 (G2) – Lavagem do conduto auditivo externo com uma solução de DMSO 10% (45 mL/animal). Grupo 3 (G3) – Solução de 12 mL contendo 3×10^6 conídios de *Duddingtonia flagrans* em veículo de óleo mineral, via tópica no pavilhão auricular. Grupo 4 (G4) - Ivermectina (Eqvalan® Pasta) 500 µg/animal, via tópica no pavilhão auricular + Lavagem do conduto auditivo externo com uma solução de DMSO 10% (45 mL/ animal), via tópica no pavilhão auricular. Grupo (G5) - Solução de 12 mL contendo 3×10^6 conídios de *Duddingtonia flagrans* em veículo de óleo mineral + Ivermectina (Eqvalan® Pasta) 500 µg/ animal, via tópica no pavilhão auricular. Grupo (G6) - Lavagem do conduto auditivo externo com uma solução de DMSO 10% (45 mL/ animal) + Solução de 12 mL contendo 3×10^6 conídios de *Duddingtonia flagrans* em veículo de óleo mineral.

A aplicação dos compostos químicos foi realizada uma vez (D0), nas orelhas direitas de cada animal na qual foi notada a presença do nematoide *Rhabditis* spp. no D-1, em que se realizou uma coleta prévia nos animais para selecionar os bovinos naturalmente infestados. Posteriormente a avaliação dos animais foi realizada nos dias 7, 14 e 21 pós tratamento, para análise de redução de carga parasitária em relação ao controle, orelha esquerda, que foi utilizado 50 mL de solução fisiológica.

4.5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade. O teste Tukey foi aplicado como um teste pós-ensaio (Ayres et al., 2003).

O percentual de redução/eficiência dos protocolos experimentais nos grupos estudados em relação ao controle foi avaliado por meio da fórmula descrita por Braga et al. (2009):

$$\% \text{ de Redução} = \frac{(\text{média do grupo controle} - \text{média do grupo tratado}) \times 100}{\text{média do grupo controle}}$$

5. RESULTADOS

Na propriedade estudada foi identificada a presença do nematoide *Rhabditis* spp., causando a recidiva da otite parasitária no rebanho bovino. Ao final do período experimental, os resultados demonstraram que houve redução percentual na recuperação dos nematoides nos grupos tratados em relação ao bruto controle ($P < 0,01$). G1: 47% (D7) e 32,4% (D21); G2: 69,6% (D7) e 41,4% (D21); G3: 39,7% (D7 e D21); G4: 36,4% (D7) e 33,6% (D21); G5: 36% (D7) e 32,6% (D21) e G6 25,4%(D7) e 38,4% (D21). Nos grupos tratados não houve diferença ($p > 0,01$) ao longo dos dias 7, 14 e 21. As médias e percentuais de redução dos nematoides *Rhabditis* spp., recuperados nos grupos de animais tratados (G1 a G6) estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Médias e percentuais de redução dos nematoides *Rhabditis* spp., recuperados nos grupos de animais tratados (G1 a G6) ao longo dos dias D7, D14 e D21 em relação aos seus grupos controles no D0.

Grupo	Dias após tratamento						
	D0 (Controle)	D7		D14		D21	
	Média	média	%R	média	%R	média	%R
G1- Ivermectina 1,87%	145 ^b	77 ^a	47%	91 ^a	37,2%	98 ^a	32,4%
G2 -Dimetilsulfóxido 10%	145 ^b	44 ^a	69,6%	67 ^{ac}	53,8%	85 ^{acd}	41,4%
G3 – AC001	232 ^b	140 ^a	39,7%	121 ^a	47,8%	140 ^a	39,7%
G4 – Ivermectina 1,87% + dimetilsulfóxido 10%	107 ^b	68 ^a	36,4%	55 ^a	48,6%	71 ^{ab}	33,6%
G5 – AC001 + ivermectina 1,87%	632 ^b	404 ^a	36%	400 ^a	36,7%	426 ^a	32,6%
G6 – AC001 + dimetilsulfóxido 10%	479 ^b	358 ^a	25,4%	320 ^{ac}	33,2%	295 ^{ac}	38,4%

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente de $p > 0.01$. Teste Tukey.

6. DISCUSSÃO

O controle da otite parasitária causada pelo nematoide *Rhabditis* spp., é difícil, tendo em vista a variedade de protocolos terapêuticos já testados sem sucesso (Souza et al., 2008; Leite et al., 2013). Em visitas à propriedade onde foi realizado o presente trabalho foi relatada a constante recidiva e novos casos acometendo o rebanho bovino em questão.

O rebanho Gir e seus mestiços são importantes na produção de leite no estado do Espírito Santo e no Brasil, doenças infecciosas e parasitárias afetam diretamente na produtividade do rebanho, como a otite causada pelo *Rhabditis* spp, comumente encontrados em bovinos dessa raça (Leite et al., 2012; Bossi et al., 2015). Dados sobre a queda na produção de leite não foram obtidos ao logo do estudo, visto que o propósito da fazenda em questão é a genética, não sendo avaliado a diminuição da produtividade animal.

No presente trabalho, o fungo *D. flagrans* (AC001) foi aplicado de forma tópica sob veículo do óleo mineral (G3), apresentando um percentual de redução de 39,7% ao longo dos dias avaliados, demonstrando a eficácia tópica de AC001. É importante ressaltar que este é o primeiro relato da administração tópica de *D. flagrans* no controle de *Rhabditis* spp., em condições naturais, o que reforça ainda mais a utilização deste fungo no controle parasitário. Corroborando com Braga et al. (2020) que registraram a eficiência e segurança da formulação comercial Bioverm® (*D. flagrans*) e que no futuro poderá atuar na prevenção e controle da otite parasitária.

O resultado apresentado acima, ainda está de acordo com o que foi proposto por Ferraz et al. (2019), que associaram fungos nematófagos com compostos químicos *in vitro* e obtiveram resultados promissores, com premissa futura de delineamentos em condições naturais, como foi no presente trabalho. Ressalta-se, contudo, que outros veículos e outras formas de administração podem contribuir para melhor efeito na eliminação do nematoide, sendo importante continuar com a pesquisa.

O uso combinado do controle químico e biológico representa um meio para diminuir as consequências causadas pelo uso inadequado de medicamentos isolados, porém em condições ambientais a ação dos agentes biológicos pode ser afetada de acordo com alguns autores (Sanyal et al., 2004; Anhalt et al., 2010). Nos grupos G5 e G6 foi associado o *D. flagrans* com compostos químicos, Ivermectina 1,87% e dimetilsulfóxido 10%, respectivamente, os resultados para esses grupos foram de taxas de redução ao final de 21 dias de 32,6% e 38,4%. Sobre este fato, a Ivermectina é um medicamento endectocida, atuando tanto no controle de nematoides parasitos gastrintestinais quanto sob ectoparasitos, porém ao longo das décadas seu uso incorreto resultou na resistência parasitária, um problema grave e global (Laing et al., 2017).

No presente trabalho, utilizou-se Ivermectina 1,87% em forma de pasta (Eqvalan® Pasta) com o objetivo de proporcionar melhor aderência do produto no conduto auditivo do animal e, evitar a queda do produto no solo quando aplicados, o uso isolado do composto, como os resultados obtidos por Lima et al. (2020), onde a ivermectina associada a outros compostos químicos apresentaram eficácia no controle do nematoide *Ancylostoma caninum*. No G1, foi observada redução de 47%

(D7), surtindo pouco efeito na eliminação dos nematoides. Contudo, outros resultados insatisfatórios, com o uso de Ivermectina 0,5% já foram relatados em outros trabalhos (Verocai et al., 2009; Barbosa et al., 2016).

No G2, a utilização de uma solução de dimetilsulfóxido 10% se mostrou eficaz, contudo a associação do composto com outros medicamentos ou a formulação de uma pasta de melhor fixação pode ser a solução para resultados mais satisfatórios futuramente. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto orgânico proveniente do processamento do petróleo utilizado na indústria farmacêutica, estudos apontam variadas ações, anti-inflamatória, antioxidante, rápida permeabilidade em tecidos, analgesia, efeito imunomodulador, carreador de substâncias, dentre outras (Rossi et al., 2007; Crivellenti et al., 2013; Picoli et al., 2015).

A associação do composto com uma pasta de Triclorfon® 3% em veículo de Nitrofurasona® resultou na cura parasitária de bovinos com otite causada pelo *Rhabditis* (Vieira et al., 2001). Ferraz et al. (2019) registraram que a utilização do dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% associados aos conídios de fungos nematófagos poderia ser utilizado em condições *in vivo* em bovinos acometidos pelo nematoide *Rhabditis* spp. Em 2002, Araújo e Guimarães avaliaram a ação do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* sobre o parasita em questão, os resultados demonstraram que *in vitro* o fungo foi eficiente, porém em condições ambientais, no ensaio *in vivo* os resultados não se repetiram. É importante ressaltar mais uma vez que até o momento não existem trabalhos com administração tópica de *D. flagrans*, sendo este uma importante contribuição para novos delineamentos.

7. CONCLUSÃO

Na propriedade estudada foi identificada a presença do nematoide *Rhabditis* spp., causando a recidiva da otite parasitária no rebanho bovino e com isso devem-se empregar medidas de controle parasitário que possam ajudar na sanidade do rebanho.

O uso combinado do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001), dimetilsulfóxido 10% e Ivermectina 1,87% no controle *in vivo* de *Rhabditis* spp., em bovinos da raça

Gir foi promissor ao final de 21 dias, sendo esta uma importante contribuição para perspectivas futuras no controle da otite parasitária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anhalt, FA., Azevedo, JL., Sugayama, RL., Specht, A. & Barros, NM.(2010) Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hypocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick)(Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. *Brazilian Journal of Biology* 70(4), 931-936.

Araújo, JV. & Guimarães, MP. (2002) Ação do fungo predador de nematoides *Monacrosporium thaumasium* sobre *Rhabditis* spp. *Ciência Animal* 12(2), 129-132.

Ayres, M., Ayres, J., Ayres, DL. & Santos, AS. (2003) BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, D.F.: CNPq.

Barbosa, JD., Silva, JB., Lima, DHS., Araújo, LHV., Santos, LL., Reis, ASB., et al. (2016) Detection and treatment of otitis by *Rhabditis blumi* in cattle of northern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36, 605-610.

Bossi, PV., Consoli, EA., Rosa, JMO., Leite, LB., Leite, RC. & De Oliveira, CMG. (2015) Molecular identification and phylogenetic analysis of *Metarhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Veterinary parasitology* 214(1-2), 184-186.

Braga, FR., Araújo, JV., Silva, AR., Araujo, JM., Carvalho, RO., Tavela, AO., et al. (2009) Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 163(4), 335-340.

Braga, FR. & Araújo, JV. (2014) Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied microbiology and biotechnology* 98(1), 71-82.

Braga, FR., Ferraz, CM., Da Silva, EM. & Araújo, JV. (2020) Efficiency of the Bioverm®(*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech* 10(2), 1-5.

Cardona, JA., González, M. & Álvarez, J. (2012) Frequency of clinical parasitic otitis due to Rhabditiform nematodes (*Rhabditis* sp) in six Gyr breed cattle farms in Cordoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25(3), 417-421.

Campos, SBS., Serodio, JJ., Brazil, DS., Silva, TV., Prado, TD. & Moura, VMDB. (2009) Evolução clínica, diagnóstico, tratamento e achados de necropsia da otite parasitária por *Rhabditis* sp. em touro da raça gir: relato de caso. *Ciência Animal Brasileira*, 677-683.

Crivellenti, LZ., Crivellenti, SB. & Carvalho, MB. (2013) Toxicidade do dimetilsulfóxido em cães hípidos e doentes renais crônicos. *Ciência Rural* 43, 1831-1837.

De Carvalho, LM., Gillespie, AT., Serra, PM., Bernardo, FA., Farrim, AP. & Fazendeiro, IM. (2007) Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102, 233-247.

Duarte, ER. & Hamdan, JS. (2004) Otitis in cattle, an aetiological review. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 51(1), 1-7.

Ferraz, CM., Sobral, SA., Senna, CC., Fidelis Junior, O., Moreira, TF., Tobias, FL., et al. (2019) Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous fungi to control *Rhabditis* spp. *Veterinary parasitology* 275, 108924.

Leite, PV., Cunha, LM., Oliveira, PR., Leite, LB. & Leite, RC. (2012) Farmers' perception about parasitic otitis in Gyr breed from three states of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 855-858.

Leite, PVB., Leite, LB., Cunha, AP., Silva, MX., Bello, ACP., Domingues, LN., et al. (2013) Clinical aspects and dynamics of auricular parasitosis in Gir cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(3), 319-325.

Lima, JAC., Ferraz, CM., Lima, M., Genier, HLA., Soares, F., Junior, D L., Braga, FR. (2020). Combined use of chemical and biological compounds to control hookworm. *Journal of Helminthology*, 94.

- Laing, R., Gillan, V. & Devaney, E. (2017) Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends in parasitology* 33(6), 463-472.
- Martins, JRW. (1985) Rhabditis (Rhabditis) freitasi sp. n. e Rhabditis (Rhabditis) costai sp. n. (Nematoda-Rhabditidae) isolados de otite bovina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 80(1), 11-16.
- Matandala, MM., Mugeru, GM. & Ngatia, TA. (2002) Prevalence of bovine (nematodes) otitis in Kenya. *Kenya Veterinarian* 25, 32-35.
- Mota, MA., Campos, AK., Araújo, JV. (2003) Controle biológico de helmintos parasitos de 326 animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23(3), 93-100.
- Msolla, P., Semuguruka, WD., Kasuku, AA. & Shoo, MK. (1993) Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Tropical animal health and production* 25(1), 15-18.
- Picoli, T., Barbosa, JS., Vargas, GD., Hübner, SO. & Fischer, G. (2015) Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmsO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). *Science And Animal Health* 3(2), 159-168.
- Rossi, CN., Oliva, V., Matsubara, LM. & Serrano, ACM. (2007) Ressuscitação cardiorespiratória em cães e gatos-revisão. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102, 197–205.
- Sanyal, PK., Chauhan, JB. & Mukhopadhyaya, PN. (2004) Implications of fungicidal effects of benzimidazole compounds on *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. *Veterinary research communications* 28(5), 375-385.
- Silva, ME., Uriostegui, MA., Millán-Orozco, J., Gives, PM., Hernández, EL. & Braga, FR. (2017) Predatory activity of Butlerius nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 26, 92-95.
- Silveira, WF., Braga, FR., Tavela, AO., Santos, LF., Domingues, RR. & Aguiar, AR. (2017) Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. *Journal of invertebrate pathology* 150, 1-5.

- Sobral, SA., Ferreira, BS., Senna, CC., Ferraz, CM., Moreira, TF., Junior, OFL., et al. (2019) Rhabditis spp., in the Espírito Santo, State of Brazil and evaluation of biological control. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 28, 333-337.
- Souza, WA., Calderaro, T., Matosinho, RDO., Pratellesi, NB., Soliva, NA. & Neves, MF. (2008) Otite parasitária causada por nematóides rhabditiformes. *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária* 6(11), 1-5.
- Tavela, AO., Araújo, JV., Braga, FR., Silveira, WF., Silva, VHD. & Júnior, M.C., et al. (2013) Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science* 94 (3), 568-572.
- Verocai, GG., Fernandes, JI., Correia, TR., Melo, RM., Alves, PA. & Scott, FB. (2007) Otite parasitária bovina por nematóides Rhabditiformes em vacas gir no estado do rio de janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16 (2), 105-107.
- Verocai, GG., Fernandes, JI., Correia, TR., Melo, RM., Alves, PAM. & Scott, FB. (2009) Inefficacy of albendazole sulphoxide and ivermectin for the treatment of bovine parasitic otitis caused by rhabditiform nematodes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(11), 910-912.
- Vieira, MCM., Silva, LAF., Borges, NC., Araújo, JLB., Santin, API. & Silva, EV. (1998) Estudo da prevalência de otites clínicas por Rhabditis sp. em bovinos da raça Gir no Estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 19-29.
- Vieira, MCM., Da Silva, LAF., Araújo, JLB., Fioravanti, MCS. & Silva, EV. (2001) Otites parasitárias por nematódeos rhabditiformes em bovinos: avaliação de tratamentos. *Ciência Animal Brasileira* 2(1), 51-55.
- Vilela, VLR., Feitosa, TF., Braga, FR., Araújo, JV., Souto, DVO., Santos, HES., et al. (2012) Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the Northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 188(1-2), 127-133.