

# Valutazione *in vitro* dell'efficacia di *Duddingtonia flagrans* utilizzando differenti dosi di clamidospore e diverse cariche di uova di strongili gastro-intestinali nelle feci ovine



**BARBARA PAOLETTI<sup>1\*</sup>, RAFFAELLA IORIO<sup>1</sup>, SIMONE MORELLI<sup>1</sup>,  
ELISABETTA DE ANGELIS<sup>2</sup>, ROBERTO BARTOLINI<sup>1</sup>, ANGELA DI CESARE<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Località Piano D'Accio snc, 64100, Teramo, Italia

<sup>2</sup> Libero professionista, Teramo, Italia

## ABSTRACT

Nematophagous fungi represent an interesting biological alternative to conventional methods. Among the various species, *Duddingtonia flagrans* stands out for its ability to pass through the gastrointestinal tract unchanged. The number of chlamydospores required for the fungus to be effective in the presence of varying concentrations of gastrointestinal strongyle (GIS) eggs is largely unknown and remains a topic of discussion. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the efficacy of *D. flagrans* in the faeces of naturally infected sheep by analyzing different concentrations of chlamydospores and varying levels of GIS egg counts. Fresh faeces from naturally infested sheep were collected in a farm in Central Italy. Based on fecal egg count, three batches of 150, 450 and 900 eggs per gram of feces (epg) were prepared. Each batch was divided into five groups. Four groups were inoculated with 1 ml of *D. flagrans* chlamydospore suspension containing 1000, 3000, 6250 or 11000 chlamydospores per gram (cpg), respectively. The fifth group served as a control, receiving 1 ml of distilled water. The cultures were incubated for 14 days at 24 °C. Each test was repeated three times for each group. Infecting larvae (L3) were recovered, counted and morphologically identified. The efficacy of *D. flagrans*, increasing with higher concentration of chlamydospore, ranging from 49.35 to 84.25% in the 150 epg groups; 40.97% to 87.47% in the 450 epg groups and 38.03% to 70.87% in the 900 epg groups. For all epg levels, the Kruskall-Wallis test showed significant differences (p-value <0.05), indicating that at least one treatment group had significantly different reduction of larvae compared to the others. Based on these results, *D. flagrans* appears to require a minimum concentration of chlamydospores in the faeces to exert a significant larvical effect. Conversely, the number of GIS eggs in the feces does not appear to be a determining factor for the fungal efficacy.

## PAROLE CHIAVE

Strongili gastrointestinali; *Duddingtonia flagrans*; Controllo biologico; Pecore.

## INTRODUZIONE

Le parassitosi causate dagli strongili gastrointestinali (SGI) rappresentano un problema sanitario ed economico importante negli allevamenti ovini e caprini [1]. Il controllo di questi parassiti, viene comunemente effettuato utilizzando farmaci antielmintici, tuttavia, l'uso eccessivo e/o inadeguato di tali prodotti ha portato, nel tempo, all'emergere e alla diffusione di resistenza agli antielmintici (RA) in diverse specie di nematodi [2], compromettendo anche la sostenibilità nella produzione animale e la biodiversità [3]. I funghi nematofagi sono considerati una valida alternativa biologica ai metodi di controllo tradizionali. Tra le diverse specie, *Duddingtonia flagrans* si distingue per la sua capacità di attraversare il tratto gastrointestinale senza subire alterazioni. Il micelio di questo fungo, che si

sviluppa a partire da spore sopravvissute al passaggio gastrointestinale, si diffonde attraverso le feci e genera strutture in grado di intrappolare, colonizzare e distruggere le larve degli strongili. È stato dimostrato che la somministrazione orale di *D. flagrans* a diverse specie di animali è efficace nella riduzione larvale nei pascoli [4, 5, 6, 7]. Tuttavia, confrontare i risultati di studi simili risulta complicato a causa delle differenti quantità di clamidospore impiegate. Alcune indagini hanno evidenziato che concentrazioni più elevate di clamidospore di *D. flagrans* possano migliorare l'efficacia nella cattura dei nematodi [8], ma altre ricerche hanno rivelato che non esiste una dose ottimale da utilizzare [9, 10], poiché essa potrebbe variare a seconda del ceppo impiegato [11]. Inoltre, sono pochi gli studi che hanno esaminato *in vitro* l'efficacia di *D. flagrans* considerando la quantità di uova di SGI presenti nelle feci [12]. Pertanto, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare *in vitro* l'efficacia di *D. flagrans* nelle feci di ovini naturalmente infestati, analizzando diverse concentrazioni di clamidospore e differenti quantità di uova di SGI.

\*Corresponding Author:  
Barbara Paoletti (bpaoletti@unite.it)

## MATERIALI E METODI

*Duddingtonia flagrans* (Mycelia NV, Belgio) è stato coltivato per quattro settimane su agar sabouraud arricchito con l'aggiunta di cloramfenicolo per inibire la crescita batterica (2% CHF-WA). Le colture sono state effettuate in piastre Petri dal diametro di 9 cm e mantenute a 24°C in un termostato [11]. Successivamente, le clamidospore di *D. flagrans* sono state raccolte spruzzando delicatamente acqua distillata sui miceli e rasciando con cura la superficie dell'agar. La sospensione miceliare recuperata è stata miscelata meccanicamente, dopodiché sono state estratte tre aliquote da 20 µl, le quali sono state diluite in acqua distillata e contate utilizzando un emocitometro di Neubauer per stimare il numero di clamidospore per millilitro d'acqua. Le clamidospore sono state conservate in acqua distillata a 4°C fino al momento dell'utilizzo. Le feci fresche di pecore naturalmente infestate, sono state campionate in un allevamento della provincia del centro Italia (Teramo). Le feci sono state analizzate utilizzando la tecnica di flottazione, e i campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad esame quantitativo con la tecnica di McMaster modificata [13]. In base alla carica fecale sono stati suddivise tre aliquote rispettivamente di 150, 450 e 900 uova per grammo di feci di SGI (upg). Ogni aliquote è stata suddivisa in cinque gruppi. Quattro gruppi sono stati inoculati ciascuno con 1 ml di una sospensione fungina di clamidospore di *D. flagrans* contenente rispettivamente 1000, 3000, 6250 o 11000 clamidospore per grammo di feci (cpg). Il

gruppo rimanente è servito da controllo, ricevendo 1 ml di acqua distillata. Le colture sono state conservate per 14 giorni a 24°C. Il test è stato ripetuto tre volte per ciascun gruppo. Le larve infestanti sono state recuperate (L3) con la tecnica di Roberts e O'Sullivan [13], in seguito sono state contate e identificate morfologicamente secondo linee guida precedentemente pubblicate [14].

## ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test ANOVA non parametrico di Kruskal-Wallis, con l'obiettivo di confrontare i gruppi trattati con i rispettivi controlli. L'analisi di correlazione è stata eseguita tramite *pairwise test* impiegando il software IBM SPSS 28. L'efficacia nematofaga per ciascuna concentrazione fungina è stata calcolata secondo la formula: Riduzione % = 100 - (L3 nel gruppo trattato x 100/L3 nel gruppo di controllo) [8].

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le specie di SGI identificati nei gruppi di controllo mediante l'analisi morfologica sono state *Haemonchus contortus* (65%), *Teladorsagia circumcincta* (25%) e *Trichostrongylus colubriformis* (10%). Le riduzioni larvali determinate, in ordine cre-

**Table 1** - Percentuale di riduzione del numero totale di larve L3 di SGI .

Numero uova (upg)	Numero clamidospore/ml		Media	Deviazione standard	Mediana	Percentile 25	Percentile 75
150	1000	L3	1636	129	1679	1491	1739
		Riduzione %	49.35	6.54	47.67	43.81	56.57
	3000	L3	1028	45	1023	985	1075
		Riduzione %	68.31	1.14	68.69	67.03	69.21
	6250	L3	775	60	791	709	825
		Riduzione %	76.15	0.16	76.20	75.97	76.27
	11000	L3	511	40	501	476	555
		Riduzione %	84.25	1.27	83.83	83.23	85.68
450	Controllo	L3	3248	232	3323	2988	3433
		Riduzione %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	1000	L3	3862	99	3893	3751	3942
		Riduzione %	40.97	0.66	40.65	40.54	41.74
	3000	L3	2759	109	2797	2636	2845
		Riduzione %	57.80	2.17	56.55	56.54	60.31
	6250	L3	1213	148	1237	1055	1348
		Riduzione %	81.46	2.17	80.79	79.70	83.89
	11000	L3	819	35	827	781	850
		Riduzione %	87.47	0.73	87.37	86.80	88.24
Controllo	Controllo	L3	6542	102	6547	6438	6642
		Riduzione %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

**Table 2** - Percentuale di riduzione del numero totale di larve L3 di SGI e comparazione con il test di Kruskall-Wallis tra i gruppi con diversa concentrazione di *Duddingtonia flagrans* e le rispettive cariche di uova. Per ogni gruppo di spore si osserva almeno una differenza significativa (p-value<0.05).

Numero uova (upg)	Numero clamidospore/ml	Riduzione% Media	Deviazione standard	Mediana	Percentile 25	Percentile 75	p-value
150	1000	49.35	6.54	47.67	43.81	56.57	0.016
	3000	68.31	1.14	68.69	67.03	69.21	
	6250	76.15	0.16	76.20	75.97	76.27	
	11000	84.25	1.27	83.83	83.23	85.68	
450	1000	40.97	0.66	40.65	40.54	41.74	0.016
	3000	57.80	2.17	56.55	56.54	60.31	
	6250	81.46	2.17	80.79	79.70	83.89	
	11000	87.47	0.73	87.37	86.80	88.24	
900	1000	38.03	3.24	39.89	34.29	39.91	0.016
	3000	46.80	0.77	46.38	46.35	47.69	
	6250	61.82	5.58	64.47	55.41	65.58	
	11000	70.87	3.06	69.52	68.71	74.37	

**Table 3** - Percentuale di riduzione del numero totale di larve L3 di SGI e comparazione con il test di Kruskall-Wallis tra i gruppi con diversa concentrazione di *Duddingtonia flagrans* e il diverso numero di uova. Per ogni gruppo di spore vi è almeno una differenza significativa (p-value<0.05).

Numero clamidospore/ml	Numero uova (upg)	Riduzione% Media	Deviazione standard	Mediana	Percentile 25	Percentile 75	p-value
1000	150	49.35	6.54	47.67	43.81	56.75	0.027
	450	40.97	0.66	40.65	40.54	41.74	
	900	38.03	3.24	39.89	34.29	39.91	
3000	150	68.31	1.14	68.69	67.03	69.21	0.027
	450	57.80	2.17	56.55	56.54	60.31	
	900	46.80	0.77	46.38	46.35	47.69	
6250	150	76.15	0.16	76.20	75.97	76.27	0.027
	450	81.46	2.17	80.79	79.70	83.89	
	900	61.82	5.58	64.47	55.41	65.58	
11000	150	84.25	1.27	83.83	83.23	85.68	0.027
	450	87.47	0.73	87.37	86.80	88.24	
	900	70.87	3.06	69.52	68.71	74.37	

scente di concentrazione fungina, sono state del 49,35%, 68,31%, 76,15% e 84,25% rispetto al gruppo di controllo con 150 upg; del 40,97%, 57,80%, 81,46% e 87,47% rispetto al gruppo di controllo con 450 upg; del 38,03%, 46,80%, 61,82% e 70,87% rispetto al gruppo di controllo con 900 upg (Tabelle nn. 1, 2).

Il test Kruskall-Wallis è risultato significativo (p-value <0,05) per tutte le aliquote testate con differenti quantità di uova, quindi almeno un gruppo presenta un valore di riduzione significativamente diverso dagli altri.

Dai confronti dei test, per ciascun aliquota di uova, emerge che le differenze significative sono comprese tra: 1000-6250 (P = 0,016) cpg, nello specifico, i valori di riduzione ottenuti con 6250 cpg sono significativamente maggiori di quelli ottenuti con 1000 cpg; tra 1000-11000 (P = 0,016) cpg, nello specifico, i valori di riduzione ottenuti con 11000 cpg sono significativamente maggiori di quelli ottenuti con 1000 cpg; tra 3000-11000 (P = 0,016) cpg, nello specifico, i valori di riduzione ottenuti con 11000 cpg sono significativamente maggiori di quelli ottenuti con 3000 cpg. Tra le altre coppie non c'è una differenza significativa (p-value>0.05) (Tabella n. 2) mentre per ogni gruppo di cpg è stata rilevata almeno una differenza significativa (p-value<0.05). Il confronto tra le diverse concentrazioni di cpg ha rivelato che per ciascun gruppo di cpg emerge solo una differenza signifi-

cattiva dai test: 150 upg - 900 upg (P=0,027), in particolare la riduzione dei valori L3 di 900 upg è significativamente inferiore rispetto a quella di 150 upg (Tabella n. 3).

In accordo con i dati emersi dal presente studio, è necessaria una concentrazione minima di clamidiospore di *D. flagrans* nelle feci per esercitare un effetto significativo sugli SGI. Diversamente, il numero di uova di SGI non risulta un fattore determinante per l'efficacia di *D. flagrans* nelle feci ovine. Questi dati sono in linea con precedenti studi condotti su feci bovine e su terreni di coltura, i quali indicano che l'attività fungina non è influenzata dal numero delle uova/larve di SGI presenti nelle feci [15, 16, 12, 17].

Tuttavia, altri studi hanno dimostrato che vi è una correlazione positiva tra l'efficacia di cattura di *D. flagrans* e un numero maggiore di uova/larve per grammo di feci [18, 19, 20], suggerendo che una maggiore densità larvale possa stimolare la formazione di trappole o reti, contribuendo così a una significativa riduzione delle larve. Pertanto, è possibile ipotizzare che la capacità predatoria di *D. flagrans* possa dipendere dalla concentrazione di clamidiospore presenti nelle feci oppure dal tipo di ceppo di *D. flagrans* utilizzato. È infatti noto che diversi isolati di *D. flagrans* mostrano livelli differenti di efficacia nella cattura delle L3 nei confronti della stessa specie di parassita [21, 22, 23], come ad esempio *Cooperia oncophora* [24, 25].

## CONCLUSIONE

I risultati della presente ricerca confermano l'efficacia di *D. flagrans* per il controllo dei SGI delle pecore. Il ricorso a strategie di controllo alternative all'uso dei farmaci è una priorità nell'ambito dell'allevamento ovino al fine di contrastare l'aumento della resistenza ai farmaci antielmintici di sintesi, limitare le perdite economiche causate delle infestazioni di SGI e dall'AR e di evitare ripercussioni negative sulla sicurezza alimentare [26, 27]. Sarebbero dunque auspicabili ulteriori studi per approfondire le informazioni sull'efficacia di *D. flagrans* in condizioni di campo e valutare l'efficacia di *D. flagrans* in combinazione con altri funghi nematofagi.

## Supporto finanziario

Questa ricerca è stata finanziata dall'Unione Europea - Next Generation EU. Codice Progetto: ECS00000041; CUP Progetto: C43C22000380007; Titolo Progetto: Innovation, digitalization and sustainability for the diffused economy in Central Italy - VITALITY

## Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esistono conflitti di interesse.

## Bibliografia

- Mavrot, F., Hertzberg, H., e Torgerson, P. 2015. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasit. Vectors*, 8: 557. doi: 10.1186/s13071-015-1164-z
- Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., De Waal, T., Skuce, P., Charlier, J., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., Hendrickx, G., Vercruyse, J., e Morgan, E.R. 2015. Widspread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet. Rec.*, 176: 546. doi: 10.1136/vr.102982
- Suarez, W. H. 2002. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet. Res.*, 33(5):563-73. doi: 10.1051/vetres:2002039.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Wolstrup, J., Grønvold, J., Nansen, P., e Bjørn, H. 1999. Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitol. Res.*, 85: 661-668. doi: 10.1007/s004360050611
- Sarkunas, M., Larsen, M., Nansen, P., e Hansen, J.W. 2000. Biological control of trichostrongylid infections in calves on pasture in Lithuania using *Duddingtonia flagrans*, a nematode-trapping fungus. *J. Helminthol.*, 74(4):355-9. doi: 10.1017/s0022149x00000524.
- Chartier, C., e Pors, I. 2003. Effect of the nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, on the larval development of goat parasitic nematodes: a plot study. *Vet. Res.*, 34(2):221-30. doi: 10.1051/vetres:2002069.
- Healey, K., Lawlor, C., Knox, M.R., Chambers, M., e Lamb, J. 2018. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Vet. Parasitol.* 15; 253:48-54. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.010.
- Terrell, T.H., Larsen, M., Samples, O., Hsted, S., Miller, J.E., Kaplan, R.M., e Gelaye, S. 2004. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet. Parasitol.*, 120: 85-296. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.09.024
- Paraud, C., e Chartier, C. 2003. Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. *Parasitol. Res.*, 89: 102-106. doi: 10.1007/s00436-002-0717-1
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L.A., Sandoval-Castro, C.A., Barrientos-Medina, R.C., e de Gives, P.M. 2008. Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Vet. Parasitol.*, 20;158(4):329-35. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.08.022.
- Sagües, M.F., Fusé, L.A., Iglesias, L.E., Moreno, F.C., e Saumell, C.A. 2013. Optimization of production of chlamydospores of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in solid culture media. *Parasitol. Res.*, 112: 1047-1051. doi: 10.1007/s00436-012-3231-0
- Zegbi, S., Sagües, F., Saumell, C., Guerrero, I., Iglesias, L., e Fernández, S. 2021. *In vitro* efficacy of different concentrations of *Duddingtonia flagrans* on varying egg densities of gastrointestinal nematodes of cattle. *Exp. Parasitol.*, 230: 108156. doi: 10.1016/j.exppara.2021.108156.
- M.A.F.F., 1986. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference book 418, H.M.S.O. London.
- Knoll, S., Densi, G., Tamponi, C., Meloni, L., Cavallo, L., Mahmood, N., Jacquiet, P., Scala, A., Cappai, M.G., e Varcasia, A. 2020. Practical guide for microscopic identification of infectious gastrointestinal nematode larvae in sheep from Sardinia, Italy, backed by molecular analysis. *Parasit. Vectors*, 14: 505. doi: 10.1186/s13071-021-05013-9.
- Gray, N.F. 1985. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematode density on distribution. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 499-507. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90017-3).
- Jaffee, B.A., Tedford, E.C., e Muldoon A. 1993. Tests for density-dependent parasitism of nematodes by nematode-trapping and endoparasitic fungi. *Biol. Contr.*, 3, 329-336
- Paoletti, B., Morelli, S., Di Teodoro, L., De Angelis, E., Bartolini, R., e Di Cesare, A. 2024. A pilot study of the in vitro efficacy of different concentrations of *Duddingtonia flagrans* for the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Ann. Parasitol.*, 70 (2): 113 - 118. doi: 10.17420/ap7002.528
- Morgan, M., Behnke, J.M., Lucas, J.A., e Peberdy, J.F. 1997. In vitro assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megasporum*. *Parasitol.*, 115, 303-310. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001297>.
- Ojeda-Robertos, N.F., de Jesús Torres-Acosta, J.F., Mendoza-de-Gives, P., Gonzalez-Garduño, R., Valero-Coss, R.O., Líebano-Hernández, E., e Ayala-Burgos, A. 2015. Optimizing the use of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores against *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, 18, 259-265.
- Sagües, M.F., Zegbi, S., Guerrero, I., Fernández, S., Iglesias, L., Junco, M., e Saumell, C. 2020. Assessment of the efficacy in vitro of *Duddingtonia flagrans* isolate 03/99 in different doses of chlamydospores and faeces egg counts in faecal of sheep. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1849560>.
- Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S.A., e Zorn, A. 1995. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. *Vet. Parasitol.*, 60, 321-330. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00791-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00791-6).
- Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., e Maia, A.S. 1993. Antagonistic effect of predacious Arthrobotrys fungi on infective *Haemonchus placaei* larvae. *J. Helminthol.*, 67: 136-138. doi: 10.1017/s0022149x00013018
- Den Belder, E., e Jansen, E. 1994. Capture of plant-parasitic nematodes by an adhesive hyphae forming isolate of *Arthrobotrys oligospora* and some other nematode-trapping fungi. *Nematol.*, 40: 423-437.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Wolstrup, J., Grønvold, J., Nansen, P., e Bjørn, H. 1999. Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitol. Res.*, 85: 661-668. doi: 10.1007/s004360050611
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Larsen, M., Gillespie, A., e Giacomazzi, F. 2004. Interspecific competition between the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and selected microorganisms and the effect of spore concentration on the efficacy of nematode trapping. *J. Helminthol.*, 78: 41-46. doi: 10.1079/joh2003195
- Charlier, J., Bartley, D.J., Sotiraki, S., Martinez-Valladares, M., Claerebout, E., von Samson-Himmelstjerna, G., Thamsborg, S.M., Hoste, H., Morgan, E.R., e Rinaldi, L. 2022. Anthelmintic resistance in ruminants: challenges and solutions. *Adv. Parasitol.*, 115: 171-227.
- Charlier, J., Hoste, H., e Sotiraki, S. 2023. COMBAR - Combatting anthelmintic resistance in ruminants. *Paras.*, 30: E1. doi: 10.1016/bs.apar.2021.12.002