



Asociación *in vitro* de *Duddingtonia flagrans* con ivermectina en el control de nematodos gastrointestinales de búfalos

Luanderson Queiroz Mendes¹ ; Carolina Magri Ferraz¹ ; Carolina Perin Motta¹ ;
Jackson Victor de Araújo² ; Emanueli Simonassi Ferrari¹ ; Jossiara Abrante Rodrigues³ ;
Júlia Rosa Luz¹ ; Rafael de Oliveira Rocha¹ ; Vinicius Longo Ribeiro Vilela^{3*} ;
Tiago Facury Moreira⁴ ; Otavio Luiz Fidelis Junior¹ ; Emy Hiura¹ ; Fabio Ribeiro Braga¹ .

¹Universidad Vila Velha, Laboratorio de Parasitología Experimental y Control Biológico, Vila Velha, Brasil.

²Universidad Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinaria, Viçosa, Brasil.

³Instituto Federal da Paraíba, Departamento de Medicina Veterinaria, Sousa, Brasil.

⁴Universidad Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica Veterinaria y Cirugía, Escuela de Veterinaria, Minas Gerais, Brasil.

*Correspondencia: vinicius.vilela@ifpb.edu.br

Recibido: Julio 2021; Aceptado: Agosto 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación *in vitro* del hongo *Duddingtonia flagrans* (AC001) e ivermectina en el control de nematodos gastrointestinales de terneros búfalo. **Materiales y métodos.** Se formaron cuatro grupos experimentales en microtubos, con cinco réplicas para cada grupo: G1 (nematodos + AC001), G2 (nematodos + ivermectina 1%), G3 (nematodos + AC001 + ivermectina 1%) y G4 (nematodos + agua destilada). Para cada grupo, después de 36 horas de interacción se leyó el contenido de los microtubos mediante microscopía óptica, contabilizando el número de nematodos por grupo. **Resultados.** Hubo una reducción larvaria significativa de los grupos tratados, con los siguientes porcentajes con relación al G4 (control): G1: 43,7%; G2: 82,3% y G3: 65,7%. También se observó que la asociación *in vitro* de *D. flagrans* con ivermectina fue más efectiva en la reducción de L3 en comparación con el uso aislado de este hongo. **Conclusiones.** Se concluyó que el uso conjunto de *D. flagrans* con ivermectina puede potenciar la eficacia del control biológico de los nematodos gastrointestinales de los búfalos, previendo su uso en las condiciones naturales de la cría de búfalos.

Palabras clave: Cría de búfalos; control biológico; hongos nematófagos (*Fuente: CAB*).

ABSTRACT

Objective. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* association of the fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001) and ivermectin in the control of gastrointestinal nematodes of buffalo calves. **Materials and methods.** Four experimental groups were formed in microtubes, with five replicates for each group: G1 (nematodes + AC001), G2 (nematodes + ivermectin 1%), G3 (nematodes + AC001 + ivermectin 1%) and G4 (nematodes + distilled water). For each group, after 36 hours of interaction, the content of the microtubes was read by optical microscopy, accounting

Como citar (Vancouver).

Queiroz ML, Magri FC, Motta PC, de Araújo JV, Simonassi FE, Abrante RJ, et al. Asociación *in vitro* de *Duddingtonia flagrans* con ivermectina en el control de nematodos gastrointestinales de búfalos. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2398. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2398>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

for the number of nematodes per group. **Results.** There was a significant larval reduction of the treated groups, with the following percentages in relation to G4 (control): G1: 43.7%; G2: 82.3% and G3: 65.7%. It was also observed that the *in vitro* association of *D. flagrans* with ivermectin was more effective in reducing L3 when compared to the isolated use of this fungus. **Conclusions.** It was concluded that the joint use of *D. flagrans* with ivermectin can potentiate the efficacy of biological control of gastrointestinal nematodes of buffalo calves, envisioning its use under natural conditions of buffalo breeding.

Keywords: Buffalo breeding; biological control; nematophagous fungi (*Source: CAB*).

INTRODUCCIÓN

Los búfalos (*Bubalus bubalis*) son importantes para la ganadería en varios países, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales (1,2). En Brasil, la crianza de estos animales ha sido fuertemente impulsada debido a su triple aptitud para la producción de carne, leche y tracción, además de su fácil adaptación a ambientes inhóspitos, principalmente humedales o áreas pantanosas (3).

A pesar de ser considerado un animal resistente a la aparición de enfermedades comunes al ganado bovino, el búfalo puede verse afectado por enfermedades infecciosas y parasitarias, siendo las crías de búfalo más susceptibles a las helmintiasis (4,5). Los cambios en el manejo y el confinamiento con alta carga animal han provocado un aumento de las enfermedades parasitarias en los rebaños (6).

Ante el problema del aumento de la resistencia a los fármacos antihelmínticos, las alternativas de control parasitario han mostrado resultados promisorios, destacándose el uso del hongo *Duddingtonia flagrans* en el control biológico de rumiantes (7,8,9). Por otro lado, el uso combinado del control biológico con el control químico puede ser una herramienta futura viable para la salud de los rumiantes en general, reduciendo la resistencia a los antihelmínticos, los costos de manejo, la toxicidad, además de reducir los residuos químicos en la carne, la leche y el medio ambiente (10).

En este sentido, Ferraz et al. (11) demostraron que el uso de compuestos químicos fue compatible con conidios de *D. flagrans*, pudiendo ser utilizados en el futuro de forma conjunta en el control de *Rhabditis* spp., nematodo causante de otitis parasitaria en bovinos. Sin embargo, los estudios sobre el control integrado de nematodos gastrointestinales de búfalos son escasos. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la asociación

in vitro del hongo *D. flagrans* e ivermectina en el control de nematodos gastrointestinales de bucerros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hongo. Se utilizó el aislado del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) para obtener la solución de conidios/clamidosporas. Este hongo se encontró en suelo brasileño y se mantuvo en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. El aislado se distribuyó en cajas Petri de 9 cm de diámetro que contenían el medio de cultivo papa-dextrosa-agar al 2% (PDA2%). Se observó crecimiento micelial en toda la placa después de 7 días de cultivo. Para obtener la solución de conidios, se agregaron 5 ml de agua destilada a cada caja Petri y con la ayuda de una espátula se vertieron los conidios y fragmentos de micelio en tubos Falcon de 15 ml (12).

Larvas (L3). Para obtener larvas infecciosas (L3), se recolectaron muestras de heces directamente de la ampolla rectal de 114 bucerros pertenecientes a una propiedad ubicada en el sureste de Brasil, 19° 23' 28" S y 40° 04' 20" W. En total se utilizaron 40 muestras y de estas se utilizaron alrededor de 4 g de heces para realizar el conteo de huevos por gramo de heces (EPG), siguiendo la metodología de Gordon y Whitlock (13). Se obtuvo una media de 500 huevos/g en la prueba EPG. Realizamos cocultivos con todas las muestras positivas, que luego se almacenaron en una incubadora de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) a 28°C durante 7 días (14). Después de este período, las larvas fueron recuperadas mediante la técnica de Baermann (15), e identificadas según los criterios mencionados por Keith (16), como *Haemonchus* spp., (65%), *Cooperias* pp. (15%), *Trichostrongylus* spp., (12%) y *Oesophagostomum* sp., (8%).

Ensayo *in vitro*. Se formaron cuatro grupos experimentales (Tabla 1). Cada grupo tuvo cinco repeticiones y cada réplica se realizó en microtubos de plástico de 1.5 ml con nematodos y el respectivo tratamiento. Los valores de L3 y conidios utilizados en los grupos se estandarizaron mediante alícuotas, manteniendo concentraciones de aproximadamente 100 nematodos/143 µl, 100 conidios/30 µl de AC001. Se leyó el contenido de los microtubos de cada grupo 36 horas después de la interacción de los nematodos versus AC001 o ivermectina 1% o AC001 asociado a ivermectina 1%, y se contó el número de nematodos mediante microscopía óptica, utilizando el objetivo 10x, siguiendo la metodología de Ferraz et al. (11).

Tabla 1. Grupos experimentales (G1 a G4) utilizados para evaluar ivermectina al 1% asociada o no al hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001), en el control de nematodos gastrointestinales de bucerros.

Grupos experimentales	Diseño experimental
G1	100 nematodos/143 µl + 100 conidios/30 µl de <i>D. flagrans</i>
G2	100 nematodos /143 µl + 8µl de ivermectina 1%
G3	100 nematodos/143 µl + 500 conidios/30 µl de <i>D. flagrans</i> + 8µl de ivermectina 1%
G4	100 nematodos/143 µl + 100µl de agua destilada

Análisis estadístico. Los resultados se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Todas las muestras mostraron una distribución normal y se sometieron al análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de la prueba de Tukey al 1% de probabilidad utilizando el software BioEstat 5.0 (17). El porcentaje de reducción se calculó mediante la siguiente ecuación propuesta por Mendoza-DeGives y Vásquez-Prates (18):

$$\text{Reducción (\%)} = \frac{(\text{Promedio de L3 recuperados de CN} - \text{Promedio de L3 recuperados de TG})}{(\text{Promedio de L3 recuperados de CN})} \times 100$$

CN – grupo de control; TG – grupo de tratamiento.

RESULTADOS

Los porcentajes de reducción de larvas infectantes se muestran en la Tabla 2. El tratamiento con conidios de *D. flagrans* (G1) redujo en 43.7% los nematodos recuperados después de 36 horas de interacción. En el grupo G2 (ivermectina 1%) la reducción fue del 82.3% y en el grupo G3 (ivermectina 1% + AC001) el tratamiento redujo el número de nematodos en un 65.7%, siendo superior a la actividad de AC001 solo. En el grupo de control negativo (G4) no hubo reducción de larvas.

Tabla 2. Medias y porcentajes de reducción de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de bucerros expuestos a ivermectina al 1% asociado o no al hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001).

Grupos experimentales	L3 recuperado (Strongylides)	
	Media	Reducción (%)
G1 – AC001	51.6 ^b ±12.6	43.7
G2 – Ivermectina 1%	16.2 ^b ±8.0	82.3
G3 – AC001 + Ivermectina 1%	31.4 ^b ±6.1	65.7
G4 – Agua destilada	91.6 ^a ±4.5	-

Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0.01$) según la prueba de Tukey al 1% de probabilidad.

DISCUSIÓN

Los estudios que evalúan la actividad de los hongos nematófagos en el control de los nematodos del búfalo son escasos. Ojeda-Robertos et al (19) demostraron *in vitro* la actividad depredadora de estos hongos contra larvas infectantes de *H. contortus*. Por otro lado, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio que mencione la asociación entre hongos nematófagos y antihelmínticos químicos en L3 de nematodos parásitos del búfalo.

En el presente estudio, la cepa de *D. flagrans* (AC001) utilizada solo demostró eficacia en la depredación de nematodos gastrointestinales de búfalos, con una reducción del 43.7% de los nematodos recuperados después de 36 horas de interacción. Barroga et al. (20) demostraron eficacia *in vitro* por la acción de este hongo, después de 48 horas de interacción, se redujo el 84,39% de las larvas del búfalo.

En el grupo tratado solo con ivermectina al 1% (G2), hubo una reducción del 82.3% de los nematodos recuperados. Se observó que el tratamiento con este compuesto químico fue más efectivo al compararlo con el uso combinado con *D. flagrans* en relación con el uso de este hongo solo. Resultados similares fueron demostrados por Ferraz et al. (11), quienes observaron una mayor eficacia en la reducción de *Rhabditis* spp. con el uso aislado de ivermectina al 1% que la combinación con este hongo. La asociación de AC001 + ivermectina al 1% (G3) demostró una reducción del 65.7% de nematodos. Esta combinación fue más eficiente en comparación con el uso aislado de *D. flagrans*. Tales resultados revelaron que no hubo un efecto antagónico de la ivermectina sobre la capacidad de depredación de las larvas por parte del hongo. Este hallazgo es compatible con el estudio de Ferraz et al (11), quienes demostraron que la ivermectina al 1% y el dimetilsulfóxido al 1% asociados a este hongo no redujeron la depredación sobre *Rhabditis* spp.

Vilela et al (21) observaron la eficacia de *D. flagrans* peletizada en matriz de alginato de sodio en asociación con Clorhidrato de Levamisol al 5% sobre nematodos gastrointestinales de ovejas. Sin embargo, estudios han demostrado una acción inhibitoria de compuestos antihelmínticos sobre *D. flagrans*, como lo describen Sanyal et al (22) y Vieira et al (23), afectando la actividad depredadora de este hongo en el biocontrol de estos parásitos.

La literatura es amplia con respecto a la efectividad del uso de hongos nematófagos como una estrategia viable para ser implementada en un sistema integrado de control parasitario. Como se mencionó anteriormente, algunos estudios recientes han demostrado que la asociación de estos hongos con fármacos antihelmínticos ha tenido éxito en la reducción de las formas larvianas de los nematodos parásitos y, desde un punto de vista sostenible, puede convertirse en una estrategia futura (11,23, 24). Sin embargo, se entiende que el uso de algún fármaco antihelmíntico puede inhibir el desarrollo de los hongos, comprometiendo su eficacia en el control biológico (25,26). Por lo tanto, los experimentos *in vitro* son necesarios para probar o no la acción sinérgica de la asociación química y biológica, como se destaca aquí.

El conocimiento del papel de los medicamentos antiparasitarios y los hongos nematófagos es de suma importancia, y a través de varios buenos laboratorios y experimentos de campo, los

científicos están transfiriendo este conocimiento a los productores rurales, en tiempos "oscuros", la ciencia prevalece (23,27,28,29). En el caso del problema de la resistencia parasitaria a los antihelmínticos disponibles, se debe prestar mayor atención al uso correcto de los compuestos químicos y la implementación de un plan estratégico para el control de parásitos. Según Szewc et al (28) el uso del control biológico con hongos nematófagos puede verse como un complemento a la rutina de crianza animal. Recientemente Braga et al (9) demostraron *in vitro* la efectividad del producto comercial Bioverm® *D. flagrans* en la reducción de L3 de *H. contortus* (99.3%) y *Strongyloides pappilosus* de pequeños rumiantes.

Estos avances en el conocimiento llevaron al desarrollo de un producto de control biológico brasileño llamado Bioverm® (GhenVetSaúde Animal Ltda.), que tiene licencia para su comercialización desde 2019. La composición de Bioverm® incluye clamidosporas del hongo *D. flagrans*, y es indicado para el control de helmintiasis gastrointestinal en rumiantes y caballos. En búfalos, se están delineando más estudios que evalúen Bioverm® en condiciones de campo. Se concluyó que el uso *in vitro* de *D. flagrans* fue efectivo en el control de nematodos del búfalo y su asociación con ivermectina fue más eficiente que su uso solo.

Conflictos de interés

Los autores no tienen conflictos de interés para declarar que sean relevantes para el contenido de este artículo.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo financiero de CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) y FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Aprobación ética

Los experimentos realizados en este estudio fueron aprobados y realizados de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética en el Uso de Animales del Instituto Federal da Paraíba (CEUA - IFPB), bajo el protocolo número 23000.999663.2019-78.

REFERENCIAS

1. Mokhber M, Moradi-Shahrbabak M, Sadeghi M, Moradi-Shahrbabak H, Stella A, Nicolzzi E, et al. A genome-wide scan for signatures of selection in Azeri and Khuzestani buffalo breeds. *BMC Genom.* 2018; 19:449. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4759-x>
2. Du C, Deng TX, Zhou Y, Ghanem N, Hua GH. Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod.* 2020; 52(1):63–69. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01984-1>
3. Nardi Júnior G, RibeiroMG, Vasconcellos SA, Megid J, Jorge AM, Geronutti L, et al. Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006; 58(3):299-304. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000300002>
4. Vilela VLR, Feitosa TF, Brasil AWL, Parentoni RN, Bezerra RA, Azevedo SS. Prevalência de parasitas gastrointestinais em búfalos no estado da Paraíba e primeiro relatório de *Cystoisospora* spp. em búfalos no Brasil. *ARS Vet.* 2017; 33:26-30. <http://doi.org/10.15361/2175-0106.2017v33n1p26-30>
5. Bier D, Teruya LS, Borges DGL, Neves JPL, Santos LB, Borges FA. Epidemiology of gastrointestinal helminths in buffaloes. *Cienc Anim Bras.* 2018; 19:1-9. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v19e-40882>
6. Dantas PCS, Lima DS, Oliveira FJ, Calasans TAS, Porto AG, Carvalho CD, et al. Ocorrência de parasitoses gastrintestinais em vacas leiteiras e respectivos bezerros durante o período de amamentação, na fazenda São Paulino, Município de Itapicuru/BA. *SciPlena.* 2015; 11(4):046121. <https://scientiaplenu.org.br/sp/article/view/2491/1185>
7. Braga FR, AraújoJV. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(1):71-82. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>
8. Vilela VLR, Feitosa TF, Braga FR, Santos A, Bezerra RA, Silva GLL, et al. Use of *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of feedlot goats. *Semina: Cienc Agrár.* 2020; 41(3):915-924. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n3p915>
9. Braga FR, Ferraz CM, Silva EM, Araújo JV. 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.* 2020; 10(2):1-5. <http://doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8>
10. Soares FB, Monteiro AC. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arq Inst Biol.* 2011; 78:385-391. <http://doi.org/10.1590/1808-1657v78p3852011>
11. Ferraz CM, Sobral SA, Senna CC, Junior OF, Moreira TF, Tobias FL, et al. Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous fungi to control *Rhabditis* spp. *Vet Parasitol.* 2019; 275:108924. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108924>
12. Araújo JV, Maia AS. Antagonistic effect of predatory fungi *Arthrobotrys* on infectious *Haemonchus placei* larvae. *J Helminthol.* 1993; 67(2):136-138. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00013018>
13. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Sci Ind Res.* 1939; 12(1):50-52. <http://hdl.handle.net/102.100.100/339340?index=1>
14. Roberts FHS, O'Sullivan JP. Methods of egg counts and larval cultures for *Strongyles* infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agr Res.* 1950; 1(1):99-102. <http://doi.org/10.1071/AR9500099>
15. Willcox HP, Coura JR. Nova concepção para o método de Baermann-Moraes-Coutinho na pesquisa de larvas de nematóides. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84(4):563–565. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000400015>

16. Keith RK. Differentiation of infective larval of some common nematode parasites of cattle. *Aust J Zool.* 1953; 1(2):223-235. <https://doi.org/10.1071/ZO9530223>
17. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 2007.
18. Mendoza-De Gives P, Vazquez-Prats VM. *Haemonchus contortus* reduction infective larvae by three nematophagous fungi in fecal sheep cultures. *Vet Parasitol.* 1994; 5(3):197-203. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)00646-G](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)00646-G)
19. Ojeda-Robertos NF, Aguilar-Marcelino L, Olmedo-Juárez A, Luna-Palomera C, Peralta-Torres JA, López-Arellano MA, et al. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi isolated from water buffalo feces and from soil in the Mexican south eastern. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019; 28(2):314-319. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019011>
20. Barroga TRM, Collantes TMA, Mingala CN. Larvicidal activity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* against common strongyle roundworms of buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Philipp J Vet Anim Sci.* 2016; 42(1):49-58. <http://pjas.org/index.php/pjas/article/download/136/129>
21. Vilela VLR, Feitosa TF, Braga FR, Vieira VD, Lucena SC, Araújo JV. Control of gastrointestinal nematodes in sheep using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Ver Bras Parasitol Vet.* 2018; 27(1):23-31. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612018008>
22. Sanyal PK, Chauhan JB, Mukhopadhyaya PN. Implications of Fungicidal Effects of benzimidazole compounds on *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. *Vet Res Commun.* 2004; 28(5):375-385. <http://doi.org/10.1023/B:VERC.0000034997.50332.77>
23. Vieira JN, Filho FSM, Ferreira GF, Mendes JF, Gonçalves CL, Villela MM, et al. *In vitro* susceptibility of nematophagous fungi to antiparasitic drugs: interactions and implications for biological control. *Braz J Biol.* 2017; 77(3):476-479. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15715>
24. Sobral SA, Ferreira BS, Senna CC, Ferraz CM, Moreira TF, Junior OFL. *Rhabditis* spp., in the Espírito Santo, State of Brazil: devaluation of biological control. *Ver Bras de Parasitol Vet.* 2019; 28(2):333-337. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019020>
25. Hirose E, Neves PMOJ, Zequi JAC, Martins LH, Peralta CH, Moino Junior A. Efeito de biofertilizantes e óleo de nim sobre os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Arq Bras Biol Technol.* 2001; 44:419-423. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132001000400013>
26. Ferreira GF, Freitas TM, Gonçalves CL, Mendes JF, Vieira JN, Villareal JP, et al. Antiparasitic drugs: *in vitro* tests against nematophagous fungi. *Braz J Biol.* 2016; 76(4):990-993. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.05615>
27. Burke JM, Miller JE. Sustainable approaches to parasite control in ruminant live stock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2020; 36:89-107. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.007>
28. Szewc M, De Waal T, Zintl A. Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *J Vet.* 2021; 268:105602. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105602>
29. Minguetto JGM, Bogado ALG, Okano W, Cunha filho LFC, Silva LC, Zanol D, Ferraz CM, Moreira TF, Tobias FL, Braga FR, Araújo JV. Biological control of gastrointestinal nematodes in Young ewes treated with fungi. *Biocontrol Sci Technol.* 2021; 31(5):499-511. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1869699>