

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“NUEVAS PERSPECTIVAS PARA EL
CONTROL DEL PARASITISMO
INTESTINAL DE CABALLOS EN
SILVOPASTOREO”**

JESÚS ANTONIO SÁNCHEZ GÓMEZ

Lugo, diciembre de 2011

Los profesores del Departamento de Patoloxía Animal (Área de Sanidade Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo) de la Universidade de Santiago de Compostela, Doña María Sol Arias Vázquez, Doña Rita Sánchez-Andrade Fernández y D. Adolfo Paz Silva,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“NUEVAS PERSPECTIVAS PARA EL CONTROL DEL PARASITISMO INTESTINAL DE CABALLOS EN SILVOPASTOREO”**, que presenta el Licenciado con Grado en Veterinaria D. JESÚS ANTONIO SÁNCHEZ GÓMEZ para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 21 de octubre de 2011.

María Sol Arias Vázquez

Rita Sánchez-Andrade Fernández

Adolfo Paz Silva

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis directores, que han sido mucho más que eso, Profesores Doctores María Sol Arias Vázquez, Rita Sánchez-Andrade Fernández y Adolfo Paz Silva por haberme propuesto un tema de Tesis tan acorde con mis preferencias y guiarme en la realización de este trabajo. A los tres, muchas gracias por vuestra inestimable ayuda, ánimo, paciencia y confianza.

A los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por darme la oportunidad de formar parte de este extraordinario grupo de investigación.

Al Dr. José Luis Suárez García de Paredes, mi maestro desde mis primeros pasos en el mundo de la Clínica Veterinaria y al Dr. Iván Francisco Vázquez, sin su colaboración hubiese resultado imposible llevar a cabo esta tarea.

A los Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez, Ángel Romasanta Blanco, Pablo Díaz Fernández, Vicente Dacal Rivas, Luis Vázquez Sande por su disponibilidad y colaboración.

A los doctorandos Pablo Piñeiro, Cristiana, Silvia e Isabel, Rubén Francisco y Javier Cortiñas, compañeros de muestreos con los que he pasado los mejores momentos durante la realización de esta Tesis.

A los ganaderos de Equino, especialmente a Ferro do Corno do Boi y a Manolo do Campo, pues nos han proporcionado desinteresadamente lo más importante, sus caballos. Gracias por pensar en nosotros y por estar pendientes de sus animales, avisarnos cuando era necesario, etc.

A los laboratorios Karizoo (Barcelona), en especial a Jordi Ysamat, por su soporte económico, por la cesión del fármaco a ensayar (Noromectin[®]), y por financiar algunos viajes para divulgar nuestras experiencias.

A mi familia, por la paciencia demostrada en las horas que yo dedico a mi *hobby*, los caballos.

Financiación

El presente Trabajo ha sido posible gracias a la financiación y colaboración de los organismos públicos y privados que se relatan a continuación:

Proyectos de Investigación

"Estudio de las principales parasitosis del caballo gallego", Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2006-2007).

"Estrategias de control biológico de los parásitos del caballo salvaje para la gestión sostenible de la biomasa en el monte gallego", Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2007-2010).

"Desarrollo de ganadería ecológica: de la sostenibilidad a la inclusión social", Consellería de Economía e Industria, Xunta de Galicia (2010-2013).

Contratos de Investigación

"Estudo das principais parasitoses do cabalo de pura raza galega", Asociación de Criadores de Cabalos Pura Raza Galega (PURAGA, Muras, Lugo) (2007-2008).

"Principales parasitosis del caballo en extensivo", Laboratorios Karizoo S.A. P.I. (Barcelona) (2008).

"Estudio de las posibilidades de control de enfermedades parasitarias en caballos de Galicia", PFIZER, S.A. (Madrid) (2008).

"Estudio do estado sanitario do cabalo Pura Raza Galega: efecto das parasitoses na reprodución", A. y C. MARPU S.L. (A Coruña).

"Aplicación de técnicas de proteómica a la investigación en Parasitología veterinaria", CELTA INGENIEROS (A Coruña) (2008-2010).

"Asesoramiento en el control de parasitosis en caballos mantenidos en extensivo en la comarca de la Cerdanya (Cataluña)", Joves Agricultors i Ramaders de Catalunya (JARC) (2009-2010).

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de este Trabajo han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

En revistas indexadas

PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., VALERO-COSS, R.O., CORTIÑAS, F.J., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., MENDOZA DE GIVES, P. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydozoospores. **Veterinary Parasitology**, 179: 277-282.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M.S., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2011). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. **Journal of Equine Veterinary Science**, 31: 530-535.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., SCALA, A., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A. (2010). A novel 2nd instars-*Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. Guidelines to an accurate chemotherapy. **Veterinary Parasitology**, 171: 314-320.

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2010). Analysis of the IgG-antibody response against *Gasterophilus intestinalis* in silvopasturing horses from NW Spain as a contribution to the chronobiology of this myiasis. **Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología**, 69: 66-71.

FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., SÁNCHEZ, J.A., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. **Veterinary Parasitology**, 164: 357-362.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., MULA, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. **Equine Veterinary Journal**, 41: 713-715.

En revistas no indexadas

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ, J.A., DACAL, V., ARAÚJO, A.M., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Sensibilización de caballos del noroeste de España frente a antígenos de *Gasterophilus* spp. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: .

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., ARIAS, M., PIÑEIRO, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Encuesta sobre el control parasitario de equinos de Pura Raza en Galicia. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: .

SÁNCHEZ, J.A., ARIAS, M., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., L. VÁZQUEZ, CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Utilización del hongo atrapa-nematodos *Duddingtonia flagrans* para fomentar la sostenibilidad del ganado equino en minifundio. **Libro de Actas del II Congreso Nacional de Zootecnia**: 184-186.

ARIAS, M., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., CORTIÑAS, F.J., DACAL, V., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ, J.A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Producción ecológica de carne: prevención de la parasitación mediante el empleo del hongo atrapa-nematodos *Duddingtonia flagrans*. **Libro de Actas del II Congreso Nacional de Zootecnia**: 154-156.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., DACAL, V., VÁZQUEZ, L., PATO, F.J., SUÁREZ, J., CASARIEGO, I., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., RIGUEIRO, A., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Aliado de la naturaleza: Équidos y sostenibilidad. **Ecuestre**, 323: 14-17.

FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., DACAL, V., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., VALERO, R., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., SUÁREZ, J., CASARIEGO, I., MENDOZA DE GIVES, P., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Investigación sobre métodos naturales preventivos: Lucha anti-parásitos. **Ecuestre**, 322: 30-32.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., DACAL, V., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., DÍEZ-BAÑOS, P., VALERO, R., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., MENDOZA DE GIVES, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Control parasitario y sostenibilidad: efecto de la carga parasitaria (ciatostómidos) sobre la eficacia *in vitro* del hongo *Duddingtonia flagrans*. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: 151-154.

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., ARIAS, M., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J.L., MOCHALES, E., VÁZQUEZ, L., MULA, P., SCALA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Control de miasis y ectoparasitosis en caballos en silvopastoreo. **Información Técnica Económica Agraria (ITEA)**, Volumen: Extra (29): 45-48.

FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., MULA, P., SUÁREZ, J.L., PRADO, J., URIARTE, J., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ, J.A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Epidemiología de las infecciones por estróngilos en équidos en sistemas de producción extensiva de Galicia: periodos de riesgo. **Información Técnica Económica Agraria (ITEA)**, Volumen: Extra (29): 53-57.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., DÍAZ, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Dificultades en la interpretación de la relación parasitación-hematología en caballos en pastoreo. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: 145-149.

FRANCISCO, I., POSE, H., SÁNCHEZ, J., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, F.J., DACAL, V., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2008). Consideraciones sobre la importancia de los principales parásitos digestivos del caballo en Galicia. **Xóvenes agricultores**, maio-xuño: 37- 45.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, J., DACAL, V., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2007). Nuevas perspectivas de control parasitario en caballos salvajes: Pura Raza Galega. **Situación actual y futuro de las razas puras**, Volumen Extra: 124.

FRANCISCO, I., ARIAS, M.S., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, J., DÍAZ, P., MORRONDO, P., SANMARTÍN, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2007). Sostenibilidad del caballo pura raza galega: estudio parasitológico. **Situación actual y futuro de las razas puras**, Volumen Extra: 123.

ARIAS, M.S., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, J., DÍAZ, P., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2007). Análisis de riesgo de infección por nematodos gastrointestinales en el caballo gallego. **Medicina y Cirugía equina**, Volumen Extra: 215-220.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, J., DACAL, V., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2007). Evaluación de la eficacia de un tratamiento antiparasitario en caballos salvajes. **Medicina y Cirugía equina**, Volumen Extra: 221-224.

ÍNDICE

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1.- EXPLOTACIÓN DE RECURSOS AGROPECUARIOS EN SILVOPASTOREO	9
<u>2.1.1. Especies animales en silvopastoreo</u>	11
<u>2.1.2. Caballos en silvopastoreo</u>	12
2.2. PRINCIPALES PATÓGENOS QUE AFECTAN AL GANADO EQUINO EN SILVOPASTOREO	14
<u>2.2.1. Parasitismos de équidos en silvopastoreo</u>	15
2.3.- DIAGNÓSTICO DE LOS PRINCIPALES PARASITISMOS INTESTINALES	22
<u>2.3.1. Diagnóstico clínico</u>	22
<u>2.3.2. Diagnóstico laboratorial</u>	23
2.4.- IMPORTANCIA DE LOS PARASITISMOS GASTROINTESTINALES EN CABALLOS	30
<u>2.4.1. Prevalencia de infección por helmintos gastrointestinales</u>	30
<u>2.4.2. Prevalencia de infección por Gasterophilus spp.</u>	36
2.5.- CONTROL DE LAS PRINCIPALES PARASITOSIS DEL GANADO EQUINO	37
<u>2.5.1. Fármacos antiparasitarios empleados en caballos</u>	37
<u>2.5.2. Guía para la elección de un antiparasitario equino</u>	39
<u>2.5.3. Eficacia de antiparasitarios</u>	41
<u>2.5.4. Población parasitaria refugia</u>	45
<u>2.5.5. Problemas de la quimioterapia</u>	46
<u>2.5.6. Terapia selectiva</u>	47
2.6.- ADMINISTRACIÓN DE LACTONAS MACROCÍCLICAS POR VÍA TÓPICA	49
<u>2.6.1. Lactonas macrocíclicas por vía tópica</u>	49
<u>2.6.2. Histología de la piel</u>	50
<u>2.6.3. Factores relacionados con la farmacocinética de antiparasitarios vía tópica</u>	51
<u>2.6.4. Eficacia de la ivermectina administrada por vía tópica</u>	55
<u>2.6.5. Efectos indeseables de la administración tópica de antiparasitarios</u>	56

3. UNIDAD TEMÁTICA	59
4. PUBLICACIONES	65
4.1. Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: Analysis of the infection by endoparasites	67
4.2. Chronobiology of <i>Gasterophilus</i> infestations in silvopasturing horses from NW Spain.	74
4.3. Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis	81
4.4. Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses	88
5. RESUMEN Y DISCUSIÓN	93
6. CONCLUSIONES	103
7. BIBLIOGRAFÍA	107



1. Introducción

La ganadería equina es una de las más antiguas en España, sin embargo, en los últimos años ha tenido lugar un cambio en su orientación, pasando de depender de su valor militar, como medio de transporte y fuente de trabajo agrario, a constituir una actividad orientada principalmente al ocio y a la producción de carne. Debido a ello, y también a la complejidad de estructuras y relaciones económicas que se han establecido en su entorno, existen pocos estudios del sector que permitan cuantificarlo y evaluarlo de manera fiel.

En Galicia, las explotaciones son fundamentalmente de cría para carne, caracterizadas por el régimen semi-extensivo o extensivo, normalmente familiares y de carácter comunal (Francisco, 2010). El número de caballos por explotación no suele superar las 20-25 cabezas.



La rentabilidad de la actividad agropecuaria depende en gran medida de las ayudas concedidas, ante esta situación, resulta imprescindible promover la sostenibilidad de las áreas rurales, para evitar su deterioro. En nuestra opinión, esto podría conseguirse mediante la combinación de los sistemas agrícolas y ganaderos, utilizando caballos que optimizan el rendimiento del sistema de pastoreo en prados pequeños y del silvopastoreo en montes y grandes extensiones.

Hay que tener además presente que la presencia de animales silvestres (rumiantes, équidos) en los montes tiene un efecto muy beneficioso en su sostenibilidad, puesto que aprovechan recursos naturales infrautilizados y contribuyen de forma directa a reducir la biomasa vegetal, disminuyendo de este modo el riesgo de incendios (Rigueiro *et al.*, 2005).

Sin embargo, este régimen de explotación puede favorecer la aparición de numerosos procesos patológicos, de etiología infecciosa y parasitaria, que suponen una merma importante de las condiciones sanitarias de los équidos y que redundan a su vez en la productividad de estos animales, ya que disminuye la eficiencia reproductiva (obtención de potros), la función desbrozadora y también las posibilidades de supervivencia. También, es importante tener en cuenta que estos animales pueden actuar como reservorios de algunas enfermedades que afectan a otros animales de renta.

Entre las enfermedades más importantes que afectan a los caballos salvajes se encuentran algunas parasitosis como cestodosis, nematodosis gastrointestinales y broncopulmonares, trematodosis o ectoparasitosis. En diversos estudios se ha demostrado que los pequeños estróngilos afectan a un porcentaje muy elevado de caballos, y que pueden llegar a ser responsables de la aparición de trastornos digestivos como cólicos.

Al igual que sucede con otras especies animales, el control parasitario en ganado equino se centra casi exclusivamente en la administración de tratamientos farmacológicos, aunque debería completarse con medidas de carácter profiláctico como:



- 1) Cuarentena de los animales a la llegada a la explotación.
- 2) Análisis parasitarios periódicos, para comprobar la presencia de formas parasitarias en los animales, y proceder a su identificación y tratamiento.
- 3) Manejo adecuado y rotación de pastos, para reducir las posibilidades de reinfección de los animales con las formas libres de los parásitos.

La administración de fármacos por vía oral o subcutánea a caballos en extensivo entraña una gran dificultad por la imposibilidad de asegurar la correcta inmovilización de los animales. Además, la complicación se incrementa por:

- a) Ausencia de infraestructuras adecuadas en las explotaciones de équidos para el manejo adecuado (mangas seguras, personal adiestrado, etc.).
- b) Coste económico actualmente imposible de afrontar teniendo en cuenta los inconvenientes del manejo de los caballos semisalvajes.
- c) Dificultad para encontrar personal cualificado, e interesado en realizar estas labores por la peligrosidad que entrañan.

La problemática de desparasitación de los caballos salvajes no supone un tema novedoso. Hasta hace relativamente pocos años, sólo se desparasitaban los caballos dóciles y se hacía mediante la administración de grandes volúmenes de fármacos, de difícil aplicación (en algunos casos se empleaba la vía naso-gástrica), que presentaban márgenes insuficientes de seguridad y de acción.



De este modo surgieron entre los propietarios de caballos algunos mitos o leyendas de dudosa base, que se extendieron sin duda alguna debido a la ausencia de profesionales veterinarios. Entre la confusión creada en el ambiente ganadero equino merece la pena destacar, por su *originalidad*, la idea de que sólo era eficaz la desparasitación a través de la vía naso-gástrica, y utilizando el denominado *triple*, formulación compuesta por piperazina, fenbendazol y neguvon, que requería la administración de un gran volumen. También se empleaba esta vía si se utilizaba carbón disulfuro, muy irritante para las mucosas orales.



Otra idea muy difundida consistía en la creencia de que los antiparasitarios eran tóxicos para los parásitos y para los caballos, conclusión a la que se llegó por el empleo de organofosforados en los años 1960-70, que podían causar cambios en la fisiología de los animales y producir alteraciones como cólicos, salivación, incoordinación de movimientos y abortos en yeguas gestantes.

En el año 2008, el Diario Oficial de Galicia publicó las bases reguladoras para poder percibir ayudas para el fomento y mejora del caballo de pura raza galega, entre otras se establece la obligatoriedad de aplicar un programa de desparasitación dos veces al año.

Teniendo en cuenta que en la actualidad todas las presentaciones farmacológicas de actividad antiparasitaria disponibles en el mercado son de administración oral, es importante destacar que en la práctica la mayoría de los caballos mantenidos en régimen extensivo no se desparasitan, y cuando se hace, no se administran las dosis adecuadas, (parte cae al suelo) ni con la frecuencia necesaria.



En explotaciones forestales con caballos autóctonos salvajes en régimen de silvopastoreo, la administración de lactonas macrocíclicas en el dorso (*pour on*) podría constituir un procedimiento idóneo ya que rebajaría la dificultad que entraña el manejo de estos animales, en especial su inmovilización, clave para la desparasitación con presentaciones vía oral o parenteral.

A la vista de estas consideraciones, hemos estimado conveniente ensayar la eficacia antiparasitaria de un fármaco administrado por vía tópica, que no requiere la inmovilización completa de los animales y ofrece otras ventajas como ahorro de tiempo y del coste de desparasitación de cada caballo.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, se ha planteado un estudio con los siguientes **OBJETIVOS**:

- 1.- Identificar los principales parasitismos gastrointestinales que afectan al ganado equino gallego en régimen de silvopastoreo.

- 2.- Analizar la eficacia de un tratamiento antiparasitario a base de ivermectina *pour on* sobre los principales nematodos intestinales del ganado equino de la Comunidad Autónoma Gallega.

- 3.- Establecer la duración del efecto de un tratamiento antiparasitario *pour on* frente a nematodos ciatostómidos.

- 4.- Estudiar la influencia de la ivermectina administrada por vía tópica sobre parámetros hemáticos y bioquímicos en potros y caballos de raza autóctona Pura Raza Galega (PRG).



2. Revisión bibliográfica

2.1.- EXPLOTACIÓN DE RECURSOS AGROPECUARIOS EN SILVOPASTOREO

En ciertas regiones de España, en especial en el Norte, cada año aumenta la superficie de tierras abandonadas, son terrenos que en otros tiempos fueron productivos, dedicados a la obtención de alimento para el ganado, cereales, etc., y que en la actualidad al dejar de explotarse, se han transformado en praderas naturales, monte bajo, eriales o matorrales.

Algunos propietarios de estas tierras, tienen animales de *fácil manejo*, como caballos, burros, ovejas o cabras para mantener en buen estado los prados de pequeña extensión. Otra opción por la que se han inclinado, para terrenos muy extensos, otrora de labradío, es la repoblación forestal con especies perennes (coníferas, eucaliptos) o caducifolias (robles, castaños, fresnos). Las administraciones públicas subvencionan esta actividad e indican las especies de árboles con las que está permitido repoblar.

Para asegurar el crecimiento adecuado de los arboles, es imprescindible evitar el expolio de nutrientes y agua del suelo por otras especies vegetales, así como asegurar el aporte de luz. Por tanto, es conveniente que el sotobosque se mantenga limpio de malas hierbas o matorral. (Sharro, 1999).

Un problema importante que acecha a estas explotaciones son los incendios que todos los años se producen debido a la presencia *generosa* de biomasa combustible generada por la vegetación sin control (López-Díaz *et al.*, 2009). Cabe destacar que en España, en la década 1991-2000 ardieron un promedio de más de 175.000 Ha anuales, la tercera parte arboladas. A las pérdidas económicas hay que añadir el deterioro de los accesos a entornos naturales y el feísmo de un paisaje que se intenta promocionar para el turismo rural, por lo que estas áreas se convierten en desfavorecidas (Rigueiro *et al.*, 1998).



Entre las técnicas para la prevención de los incendios forestales, destacan los desbroces mediante procedimientos diversos y el pastoreo controlado.

La limpieza del bosque con abundancia de matorral resulta complicada y costosa. En muchos casos, sobre todo en el invierno, las maquinas desbrozadoras no pueden acceder a terrenos con elevadas pendientes y carentes en la mayoría de los casos de infraestructuras de acceso (viales, pistas, etc.) y en periodos secos están prohibidas estas prácticas porque entrañan peligro de incendio.

Se entiende por DESARROLLO SOSTENIBLE aquél que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer las propias (*Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo, 1987*). Productividad, estabilidad y sostenibilidad son tres cualidades que caracterizan los agroecosistemas y que a menudo se encuentran en conflicto.



Los *sistemas silvopastorales* son métodos de gestión del territorio agroforestal basados en la producción forestal arbórea y ganadera bajo un procedimiento integrado de pasto. Se trata de sistemas intrínsecamente sostenibles que incrementan la diversidad biológica, protegen la calidad del agua, reducen la erosión del suelo y favorecen la capacidad de retención de humedad de la tierra (*Bradshaw et al., 2003*).

El pastoreo en el monte, cuando el ganado se elige convenientemente y se maneja adecuadamente puede convertirse en un importante aliado en la prevención de los incendios, reduciendo el combustible vegetal del sotobosque al mismo tiempo que incrementa la renta del monte, añadiendo la producción de carne a la de madera.

Desde el punto de vista del aprovechamiento económico, es importante tener en cuenta que el rendimiento de las explotaciones forestales no se obtiene hasta que transcurren 20-30 años (según la especie vegetal), por lo que la introducción de especies animales podría proporcionar unos ingresos económicos *inmediatos y regulares* muy convenientes para los granjeros (*Husak y Grado, 2002*).

No hay que olvidar, que al mismo tiempo se generan otros beneficios, como un mejor paisaje, transitabilidad por el monte más cómoda, mayor producción de setas, etc. (*Mosquera et al., 2001*).

2.1.1. Especies animales en silvopastoreo

Desde hace décadas, en diversos países se vienen realizando experiencias de control del combustible vegetal del sotobosque mediante pastoreo como técnica de prevención de incendios forestales. Los buenos resultados han impulsado el crecimiento de este tipo de explotaciones de silvopastoreo promovidas por diferentes administraciones públicas y asociaciones de agricultores y ganaderos.

En España existen diferentes grupos de investigación que tratan de establecer las condiciones más provechosas para los sistemas de silvopastoreo. Se han obtenido resultados prometedores con ganado vacuno, ovino, caprino y porcino, y en los últimos años se ha empezado a introducir el ganado equino.

En la Universidad de Santiago de Compostela, el grupo que dirige el profesor Dr. Rigueiro Rodríguez (Dpto. de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior) lleva más de 5 lustros ensayando diferentes posibilidades de silvopastoreo con cabras, vacas, ovejas, cerdos y caballos, en plantaciones de *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster*, *P. sylvestris* y *P. radiata*, con buenos resultados desde el punto de vista del incremento de producción del monte y reducción del riesgo de incendios.



Merced a estos estudios, se ha podido comprobar que los bovinos y ovinos reducen la presencia del brezo, pero no la del tojo. Las cabras resultan adecuadas para aprovechar matorral como el tojal, pero su introducción en zonas con árboles jóvenes acarrea graves trastornos, puesto que su agilidad les permite subir a las ramas más bajas y alimentarse de brotes tiernos, ralentizando el crecimiento de las especies arbóreas y perjudicando su rendimiento. El mantenimiento de ganado porcino en estos sistemas proporciona una herramienta muy eficaz para la eliminación de helechos, dado que estos animales se aprovechan de los rizomas cuando hozan (Rigueiro *et al.*, 2005).

Existe un criterio casi unánime de que el desarrollo de sistemas silvopastorales requiere de la aplicación de diferentes fases. En la primera, cuando el pasto leñoso es abundante, es aconsejable introducir especies lignívoras como cabras y caballos, animales que admiten una elevada proporción de pasto leñoso en su dieta. Con el pastoreo de estos animales, la vegetación del sotobosque evoluciona, reduciéndose la cobertura de las especies leñosas e incrementándose la de las herbáceas, lo que hace recomendable sustituir el ganado lignívoro por herbívoros (como ovejas y vacas). Sin embargo, no se debe suprimir totalmente el pastoreo con lignívoros para evitar que el matorral se recupere (Rigueiro *et al.*, 2009).

2.1.2. Caballos en silvopastoreo

Diversos estudios han demostrado que el caballo es compatible con la explotación de diferentes especies vegetales, como pinos y eucaliptos, incluso desde edades tempranas del arbolado, ya que no los come y controla bien los tojos, retamas y gramíneas duras; y que sólo es compatible con frondosas cuando ya no alcanza las copas. (Rigueiro *et al.*, 2001). En algunas investigaciones se ha llegado a comprobar que el efecto de pastoreo de los caballos reduce la biomasa del sotobosque en un 80% (Rigueiro *et al.*, 1998).

Recientemente se ha demostrado que el ganado equino en silvopastoreo controla bien el estrato arbustivo dominado por tojos, pero ante la desaparición de esta especie vegetal, consumen y controlan otras que les resultan menos palatables, como *Rubus* sp.



Una vez demostrado el beneficio del ganado equino para aprovechar los pastos naturales de las áreas forestales, el siguiente punto importante consiste en establecer qué razas resultarían las idóneas. Es necesario tener en cuenta que los caballos en silvopastoreo viven en situaciones desfavorables en cuanto al medio (grandes variaciones de temperatura, orografía del terreno) y a los cuidados que van a recibir (alimentación, vigilancia sanitaria), puesto que este régimen de explotación no facilita que puedan proporcionarseles de igual modo que a animales estabulados o en granjas (Francisco *et al.*, 2009a).

Los resultados de diferentes estrategias de silvopastoreo en nuestro país han revelado que se debe emplear ganado de razas rústicas y compatibles con el arbolado, capaz de alimentarse básicamente del pasto natural que crece debajo. También es importante destacar que no se trata de que los caballos *sobrevivan* en estas condiciones, sino que han de ser productivos, y esta característica se medirá sobre la acción en el medio (desbroce, aclaramiento de zonas arbustivas) y sobre la producción ganadera (crías).

Por todo ello, parece lógico considerar a los caballos de razas autóctonas como candidatos ideales debido a su adaptación natural a condiciones climáticas y alimentarias desfavorables.

Todos estos resultados han permitido concluir que el planteamiento idóneo de los sistemas de silvopastoreo debería incluir una primera fase de introducción de ganado rústico equino/caprino para reducir la presencia de matorral y favorecer el crecimiento de pradera natural, y una segunda fase en la que bovinos y ovinos se alimentasen de los pastos naturales. Como estas especies no aprovechan el matorral, habría que incluir de nuevo a los caballos/cabras.

Los beneficios que se derivan de la presencia de animales rústicos que se alimentan del pasto natural se centran no sólo en la reducción del matorral y de la vegetación no deseada, etc., hay que considerar también que su acción redundará en disminución del gasto en herbicidas y maquinaria para el desbroce, lo cual supone además un importante apoyo a la gestión ecológica del bosque. Esta estrategia de manejo de las superficies agrarias se está haciendo muy importante en áreas con coníferas.



Con el paso del tiempo, el sotobosque tendrá cada vez mayor extensión de



pastos naturales y el rendimiento pecuario de los caballos se incrementará, no sólo porque estarán mejor alimentados sino también porque resultará sencillo el acceso a lo animales para vigilar que el estado sanitario de los caballos sea el apropiado y la consecuencia de todo supondrá un mayor aporte económico para el agricultor-ganadero, obtenido de forma *sostenible y respetuosa* con el medio.

2.2. PRINCIPALES PATÓGENOS DEL GANADO EQUINO EN SILVOPASTOREO

Muchas enfermedades infecciosas pueden mermar la capacidad reproductora de los caballos, pero no existe información acerca de la influencia del tipo de mantenimiento de los equinos (estabulado, pastoreo) en su prevalencia. La arteritis viral equina (AVE) tiene gran importancia por su repercusión sobre la productividad de los animales, aunque afortunadamente existe una forma de prevención y control de esta enfermedad, mediante el uso de una vacuna con virus vivos avirulentos (MacLaghlan y Balasuriya, 2006).

La metritis contagiosa equina (MCE) es una enfermedad venérea causada por *Taylorella equigenitalis*, altamente contagiosa como se desprende de su nombre (Erdman *et al.*, 2011). Puede cursar de forma subclínica en las yeguas, o presentarse con inflamación de los tejidos (endometritis, cervicitis, vaginitis), descarga vaginal e infertilidad. Los sementales actúan de transportadores y no muestran signos clínicos (Timoney, 1996). Esta enfermedad puede provocar pérdidas económicas importantes no sólo por infertilidad en las hembras, sino también por restricciones en el movimiento de animales, exportación a otros países, comercio de semen, etc. El diagnóstico consiste en el aislamiento de *T. equigenitalis* mediante cultivo de muestras de los genitales externos de los sementales y del tracto reproductivo proximal y distal de las yeguas.

Prácticamente todos los caballos que se mantienen en régimen de pastoreo están infectados por diferentes agentes parasitarios, entre los que cabe destacar, por su elevada frecuencia, nematodos estróngilos, ascáridos, oxiúridos, y cestodos (Arias *et al.*, 2011). También son muy frecuentes las infestaciones por ectoparásitos (garrapatas, ácaros de la sarna, moscas) y las miasis, enfermedades ocasionadas por las fases larvianas de ciertas moscas (Cortiñas *et al.*, 2010). Puesto que se trata de caballos *casi salvajes*, las posibilidades de desparasitación suelen ser muy escasas, ya que se requiere un gran número de personas y mucho tiempo, en casos de manadas numerosas, para poder inmovilizar los animales y administrarles correctamente los productos antiparasitarios (Francisco *et al.*, 2009b).

2.2.1. Parasitismos de équidos en silvopastoreo

Los sistemas intensivo, semi-extensivo y extensivo constituyen los procedimientos clásicos de cría de animales, clasificación prácticamente fundamentada en el tiempo que los animales pasan en el pasto (Zhou *et al.*, 2004; Gaspar *et al.*, 2008) y cada uno de estos sistemas favorecen la aparición de determinadas enfermedades.

En general, bajo sistemas intensivos de manejo son más frecuentes las infecciones por protozoos que afectan al aparato digestivo y liberan al medio ooquistes con las heces del hospedador, este régimen de explotación también favorece ciertos ectoparasitismos (sarna, infección por piojos).

En el ciclo de los helmintos (cestodos, trematodos, nematodos), se intercala una fase externa en el medio, en el ambiente las formas parasitarias (huevos, larvas) eliminadas a través de las heces de animales parasitados se desarrollan hasta alcanzar estadios infectivos (larvas, metacercarias). Cuando los caballos se alimentan en pastos contaminados con formas parasitarias infectivas, se produce su infección.

Según estas apreciaciones, los animales en régimen extensivo o semi-extensivo estarían expuestos principalmente a la infección por helmintos, sin embargo, no hay que olvidar que determinadas prácticas relacionadas con la cría de los animales en intensivo, como la administración de forraje fresco, podrían incrementar el riesgo de infección por helmintos como *Moniezia*, *Fasciola*, y nematodos gastrointestinales en animales estabulados de forma permanente y que la suplementación de alimento, principalmente mediante el empleo de comederos, puede incrementar la exposición a protozoos en los animales en semi-extensivo y extensivo.

Entre los parásitos helmintos que más frecuentemente afectan a los caballos se encuentran los nematodos gastrointestinales, destacando los pequeños y grandes estróngilos, ascáridos y oxiúridos (Cordero y Rojo, 1999; Francisco, 2010) y la forma adulta del cestodo *Anoplocephala*. Todos ellos son patógenos intestinales, en especial los grandes estróngilos por las características de su ciclo intraorgánico. En la Comunidad Autónoma Gallega, se ha comprobado que los más frecuentes eran los estróngilos, seguidos por ascáridos, oxiúridos y cestodos (Francisco, 2007; Francisco, 2008).

Las gasterofilosis del caballo son parasitosis debidas a la presencia y desarrollo en el tubo digestivo del caballo, de larvas de moscas del género *Gasterophilus*. Afectan a los équidos que permanecen en los prados durante las horas más calidas del día. Son parasitosis invernales como consecuencia de las infecciones estivales.

Aunque existen pocos datos acerca de las principales infecciones parasitarias que afectan a caballos de monte, estudios realizados por el Grupo para el Estudio de Enfermedades de Équidos (Parasitología, Epidemiología y Enfermedades parasitarias) de la Universidad de Santiago de Compostela, (Francisco *et al.*, 2009b, c) demostraron que los caballos silvestres sufren similares parasitismos que los caballos dedicados al ocio que se mantienen en prados.

En un estudio reciente, Arias *et al.* (2011) comprobaron que sólo eliminaban huevos de cestodos los caballos en semi-extensivo y que además el 62% de estos animales eliminaban huevos de strongílidos, al igual que el 32% de los que permanecían de forma permanente estabulados (intensivo), y el 93% de los mantenidos de forma constante en pastoreo.

a) Nematodos estróngilos

Existen 2 subfamilias de estróngilos, que en función del tamaño de la forma adulta se conocen como grandes y pequeños estróngilos. Los *grandes estróngilos* pertenecen a la subfamilia Strongylinae (Osterman Lind, 2005), y los géneros más importantes son *Strongylus*, *Triodontophorus*, *Oesophagodontus*, *Craterostomum* y *Bidentostomum*. Los adultos miden entre 15-45 mm por 1-2 mm, poseen cápsula bucal bien desarrollada en la que puede haber dientes o placas cortantes y doble corona foliácea. Las estrongilosis por grandes estróngilos se observan en caballos de todas las edades, aunque la gravedad de los signos clínicos es mayor en potros. Se consideran los principales responsables de la mayoría de cólicos de etiología parasitaria, en particular *Strongylus vulgaris*. Son habituales también de

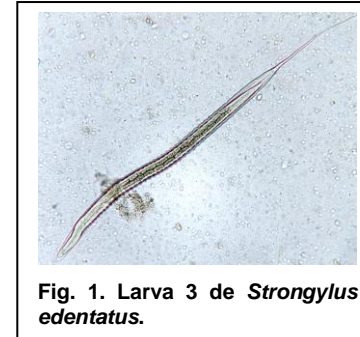


Fig. 1. Larva 3 de *Strongylus edentatus*.



Fig. 2. Larva 3 de *Cyathostomum*.

équidos en pastoreo y las épocas de mayor riesgo de infección son otoño y primavera, que es cuando se dan las condiciones adecuadas para el desarrollo y supervivencia de sus fases larvares en los pastos, praderas, etc. (Uhlinger, 1990; Mair *et al.*, 2000) (Fig. 1).

Los *pequeños estróngilos* pertenecen a la subfamilia Cyathostominae (Fig. 2), miden entre 5 y 20 mm y tienen la cápsula bucal menos desarrollada que los grandes estróngilos, todos tienen coronas foliáceas externas e internas bien diferenciadas (Chapman *et al.*, 2001). De entre los géneros existentes hasta el momento en la Península Ibérica se han identificado *Cyathostomum*, *Poteriostomum* y *Gyalocephalus* spp (Francisco *et al.*, 2009a). (Fig. 3).



Fig. 3. Extremo anterior de ciatostómidos.

En estudios realizados en los últimos años se ha demostrado que las especies de los géneros *Triodontophorus*, *Oesophagodontus* y *Craterostomum* son más próximas filogenéticamente a la subfamilia Cyathostominae (Hung *et al.*, 2000), y actualmente se tienden a considerarlos integrantes de esta subfamilia (Osterman Lind, 2005).

Los estróngilos tienen ciclo directo. Tras la eclosión de los huevos expulsados al exterior con las heces de los caballos, se libera la larva 1, que en presencia de condiciones ambientales adecuadas (humedad elevada y temperatura moderada), se desarrolla a larva 2 y larva 3, forma infectiva (Chapman *et al.*, 2001). El caballo se infecta cuando ingiere hierba con larvas 3.

Para continuar el desarrollo, las larvas 3 de los pequeños estróngilos invaden la pared del intestino grueso, la mayoría de las especies la mucosa del ciego y del colon. La reacción del hospedador frente a esta invasión se caracteriza por una



Fig. 4. Lesiones en la mucosa intestinal provocadas por nematodos estróngilos.

marcada eosinofilia alrededor de las larvas y la formación de edema en la mucosa. La entrada de larvas de ciatostomas en la luz de las glándulas tubulares suele provocar inflamación de la zona junto con marcada hipertrofia celular (Fig. 4). Cuando las larvas salen hacia la luz intestinal provocan infiltración masiva de la mucosa con eosinófilos (Urquhart *et al.*, 2001).

Si los équidos ingieren con el pasto larvas de grandes estróngilos, éstas llegan al intestino, lo atraviesan y empiezan una complicada y prolongada migración por distintos órganos. Así, las larvas de *Strongylus vulgaris* penetran en las arteriolas que irrigan el intestino delgado y grueso, y ascienden en dirección contraria a la circulación sanguínea hasta llegar a las arterias mesentéricas, provocando su dilatación (Fig. 5). Durante este trayecto, se forman trombos que pueden llegar a desprenderse y ocluir los vasos sanguíneos, provocando la formación de zonas necrosadas, con los consiguientes cólicos, a veces muy violentos, que incluso pueden llegar a provocar la muerte del animal (Love *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2008). Las larvas 3 de *S.*



Fig. 5. Arterias mesentéricas engrosadas por la presencia de *S. vulgaris*.

edentatus viajan por el sistema portal hasta alcanzar primero el parénquima hepático, después por debajo del peritoneo alcanzan los ijares y los ligamentos hepáticos y terminan su migración en la pared del intestino grueso en la que forman un gran nódulo purulento, que al romperse libera los parásitos a la luz intestinal. El proceso de migración de *S. equinus* es el menos conocido, sus larvas forman nódulos en la capa muscular y subserosa del intestino, se han encontrado larvas migrantes en la cavidad peritoneal, hígado y páncreas.

Los estróngilos adultos se localizan en colon y ciego donde se alimentan de distintos nutrientes siendo esta acción expoliadora su principal mecanismo patógeno. Todos los estróngilos poseen cápsula bucal grande que permite atrapar un gran tapón de mucosa intestinal, digerirla, romper los capilares e ingerir sangre (Fig. 4). En infecciones moderadas no dan lugar a anemia, aunque sí causan una disminución de la vida de los glóbulos rojos. En infecciones por mayor número de vermes las pérdidas repetidas de sangre pueden producir anemia normocítica y normocrómica. Los daños en la mucosa pueden provocar síndrome de mala-absorción (Giles *et al.*, 1985; Love y McKeand, 1997).

b) Nematodos ascáridos

La especie que afecta a los caballos es *Parascaris equorum*, este nematodo blanquecino y que destaca sin duda por su gran tamaño (Fig. 6), las hembras pueden llegar a alcanzar los 50 cm, no se confunde con ningún otro parásito intestinal de los équidos. Está difundido por todo el mundo y los potros son más susceptibles de sufrir esta infección (Rieder *et al.*, 1995; Francisco *et al.*, 2007c).

Los adultos se localizan en el intestino y eliminan con las heces grandes cantidades de huevos casi esféricos de color marrón y cáscara gruesa muy resistentes a



Fig. 6. Hembra adulta de *P. equorum*.

condiciones ambientales adversas así como a los desinfectantes más habituales. En el medio externo, los huevos se convierten en infectivos cuando en su interior se forma la larva 2. Después de la ingestión y eclosión en el intestino, las larvas 2 atraviesan la pared intestinal y en 48 horas llegan al hígado. Aproximadamente dos semanas después de la infección alcanzan los pulmones y migran hacia los bronquios y la tráquea; con las expectoraciones las larvas que se encuentran en el moco traqueo-bronquial, suben hasta la faringe y son deglutidas alcanzando el intestino delgado en donde completan su desarrollo (Hearn y Peregrine, 2003).

En la patogenia de las infecciones por *P. equorum* es necesario establecer dos periodos, la acción de las larvas durante la migración, y la presencia de estadios inmaduros y adultos en el intestino. En el hígado, las larvas al avanzar causan hemorragias focales y soluciones de continuidad que con el tiempo son reemplazadas por tejido conectivo de color blanquecino, por lo que reciben el nombre de *manchas de leche* (Kornas *et al.*, 2006). (Fig. 7). La migración larvaria en los pulmones también provoca petequias y hemorragias de los capilares, dando lugar a bronquitis y bronquiolitis eosinofílicas. El aumento de la mucosidad y las lesiones inflamatorias de alveolos, bronquios y bronquiolos causan dificultades en la ventilación pulmonar (Slocombe *et al.*, 2007). Aunque la presencia de vermes en el intestino no se asocia con daños específicos, en caso de infecciones masivas pueden provocar invaginaciones, oclusiones, rotura del intestino a nivel del ligamento mesentérico y peritonitis.

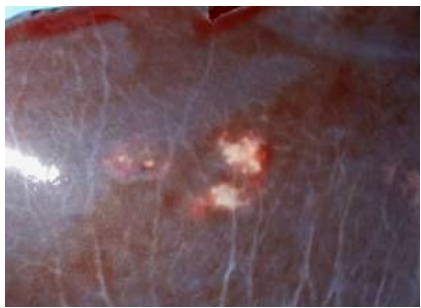


Fig. 7. Manchas de leche en el hígado provocadas por la migración de larvas de *P. equorum* por el parénquima.

c) Nematodos oxiúridos

Oxyuris equi (Fig. 8) es un parásito muy común del caballo, las hembras maduras son vermes largos y blancos con extremos posteriores puntiagudos que pueden alcanzar hasta 15 cm, mientras que los machos generalmente miden alrededor de 1 cm (Chapman *et al.*, 2002; Pereira y Vianna, 2006). Los adultos se localizan en la luz del colon; después de la fertilización, la hembra grávida migra al ano y deposita sus huevos en montocitos que parecen rayas gelatinosas amarillentas. Con frecuencia la hembra estalla y los huevos se diseminan por el maslo de la cola y la zona perineal. La infección se produce al ingerir comida o agua de bebida contaminada con huevos del parásito, que ya tienen una larva formada en su interior (Kuzmina *et al.*, 2005).



Fig. 8. Adulto de *O. equi*.

La alteración principal es la irritación perineal provocada por sustancias liberadas por las hembras que estallan (Kuzmina *et al.*, 2005). Estas masas de restos de vermes son irritantes, causan prurito induciendo el rascado en los caballos, produciendo inflamación, erosiones y

heridas. Cuando las larvas de *O. equi* se hallan en gran número producen inflamación de la mucosa intestinal. Los adultos no son patógenos, ya que no tienen comportamientos depredadores (Lyons *et al.*, 2006).

d) Cestodos

Los cestodos que afectan al ganado equino pertenecen al género *Anoplocephala* (Romaniuk *et al.*, 2004). Son parásitos fácilmente reconocibles por su morfología aplanada dorsoventralmente (Fig. 9), con una longitud que puede oscilar entre 1 a 5 cm de longitud para *Paranoplocephala mamillana*, 20 a 80 para *Anoplocephala magna* y de 4 a 8 cm en el caso de *Anoplocephala perfoliata*

Las formas adultas del parásito se localizan en el intestino delgado, en las proximidades de la válvula ileocecal, y eliminan con las heces proglotis grávidos repletos de huevos, que cuando son ingeridos por ácaros de la hierba se transforman en cisticercoides (Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999). Los caballos se infectan cuando ingieren ácaros oribátidos al pastar, y en el intestino los cisticercoides se transforman en cestodos adultos (Lyons *et al.*, 2006).



Fig. 9. Adultos de *A. perfoliata*.

Aunque estos organismos han sido considerados no patógenos, la importancia de los signos clínicos (cólicos, impactación ileal, intususpecciones) está muy relacionada con el número de parásitos adultos fijados en la mucosa intestinal. *A. perfoliata* es la que se relaciona más a menudo con cuadros de cólicos (Meana *et al.*, 2003; Traversa *et al.*, 2008). Las invaginaciones intestinales asociadas a los anaplocefalos conciernen esencialmente a los caballos menores de cuatro años. En los équidos que soportan gran cantidad de adultos, el parásito que compite por los nutrientes ocasiona debilitamiento del caballo, lo que complica el cuadro clínico (Fogarty *et al.*, 1994).

En un estudio realizado en caballos sacrificados en un matadero de Madrid se clasificaron las lesiones producidas por *A. perfoliata* en la unión ileocecal teniendo en cuenta la intensidad del daño, y se relacionaron con el número de cestodos observados (Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999). Las alteraciones de grado I consistían en enteritis débil con erosiones focales en el 43% de los equinos con carga parasitaria baja (1-26); el grado II se asignó al cuadro de enteritis pseudomembranosa presente en la unión ileocecal de 36% caballos parasitados por una tasa moderada-alta (23-188), y con el grado III se designó la enteritis necrotizante que padecía el 21% de los equinos con la intensidad parasitaria más elevada (72-248).

e) Miasis: gasterófilos



Fig. 10. Larvas de *Gasterophilus* spp. en estómago de caballo.

La miasis específica del ganado equino doméstico y silvestre está causada por larvas de moscas del género *Gasterophilus* (Sandin *et al.*, 2000) (Fig. 10). De las ocho especies existentes (*G. intestinalis*, *G. nasalis*, *G. haemorroidalis*, *G. pecorum*, *G. nigricornis*, *G. inermis* y *G. haemorroidalis*), *G. intestinalis* (mosca zumbadora común) es la más frecuente en la Península Ibérica. Las moscas adultas son muy parecidas a las abejas, de color marrón, grandes, peludas y ponen huevos amarillos sobre distintas regiones del animal durante los meses de verano.

Dentro de los huevos se desarrolla una larva (Fig. 11). Los caballos ingieren los huevos al lamerse y, en ocasiones las larvas liberadas con el lamido reptan por la piel hasta llegar a la boca. Una vez en la

cavidad bucal penetran en la mucosa donde aumentan de tamaño y se convierten en larvas de segundo estadio, que son deglutidas (Bermúdez *et al.*, 2007).

En su localización definitiva mudan a larvas de tercer estadio y permanecen fijadas a la mucosa del tracto gastrointestinal unos 10-12 meses gracias a unos potentes ganchos bucales. Transcurrido este tiempo se liberan y salen con las heces del animal al exterior. Pasados 1 ó 2 días pupan durante 3 a 5 semanas para dar lugar a las moscas adultas (Cortiñas, 2009; Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).



Fig. 11. Larva 1 de *Gasterophilus* spp. en interior de huevo adherido al pelaje del caballo.

2.3.- DIAGNÓSTICO DE LOS PRINCIPALES PARASITISMOS INTESTINALES

2.3.1. Diagnóstico clínico

La intensidad de los signos clínicos en las infecciones parasitarias en équidos, depende no sólo del agente etiológico o del número de parásitos, sino también de la condición corporal del animal, su estado fisiológico o la época del año (Matthews y Morris, 1995). En general, la presencia de parásitos internos como nematodos o cestodos suele cursar de forma subclínica, provocando, pérdida de peso, alteraciones en el hemograma (anemia, linfocitosis) y mal aspecto del pelaje (Fig. 12) (Proudman y Matthews, 2000; Ionita *et al.*, 2010).

Casi no existen estudios que versen sobre las protozoosis equinas, y menos aun sobre su significación clínica. No se ha observado relación entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y la presencia de diarrea en potros (Burton *et al.*, 2010).



Fig. 12. Caballos en silvopastoreo.

Numerosas investigaciones han establecido la correlación entre la parasitación por cestodos en equinos (*A. perfoliata*) y la aparición de alteraciones digestivas entre las que cabe destacar los cólicos (Meana *et al.*, 1998; Proudman *et al.*, 1998; Barrett *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005; Trotz-Williams *et al.*, 2008; Traversa *et al.*, 2008).

La infección por ciatostómidos provoca una enteropatía inflamatoria que resulta en la alteración de la motilidad y microcirculación intestinal (Love *et al.*, 1999). En caballos con formas adultas es frecuente que curse con signos como diarrea intermitente, pérdida de peso, mal aspecto del pelaje, anorexia, letargia con desorden de la motilidad intestinal, deterioro de la condición y edema periférico (Matthews y Morris, 1995). Se han encontrado valores anormalmente incrementados de actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin-kinasa (CK), estableciéndose una correlación positiva entre la eliminación de huevos de ciatostómidos y los valores séricos de actividad LDH (Francisco *et al.*, 2011a).

La ciatostominosis larvaria se asocia a la aparición de diarrea severa, pérdida de proteínas a nivel sanguíneo y disminución del peso (Ionita *et al.*, 2010). Los parámetros bioquímicos alterados son hipoalbuminemia (≤ 20 g/L) y disminución del ratio albumina/globulinas (≥ 0.7) (Chapman *et al.*, 2001).

Los grandes estróngilos son más patógenos que los pequeños, debido a las migraciones intraorgánicas que realizan. La aparición de trombos y arteritis, cólico severo e incluso la muerte de los equinos se ha relacionado con la infección por *S. vulgaris*, considerado el principal patógeno de los caballos (Nielsen *et al.*, 2008). En los últimos años el empleo intensivo de antihelmínticos ha reducido su prevalencia (Döpfer *et al.*, 2004; von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007).

En potros parasitados con *Parascaris equorum* pueden observarse signos clínicos muy variados, fundamentalmente problemas respiratorios, como tos y moqueo nasal que señalan el paso de las larvas a nivel pulmonar. Igualmente pueden aparecer complicaciones de bronco-neumonía. La presencia de adultos se manifiesta por un cierto retraso en el crecimiento, pelaje sin brillo y episodios diarreicos. En infecciones masivas, las formas adultas pueden ocluir parcial o totalmente el intestino. Los animales pueden presentar hinchazón en el vientre, e incluso peritonitis. El nivel de albúmina corporal y sérica es inferior al de los potros sanos.

En la habronemosis gástrica de caballos se mencionan signos como diarrea, pérdida de peso progresiva, gastritis catarral y ulceraciones (Traversa *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta la inespecificidad de gran parte de los signos mencionados, resulta necesario que el diagnóstico clínico se confirme con la identificación laboratorial del agente etiológico.

2.3.2. Diagnóstico laboratorial

Los métodos de diagnóstico de laboratorio habituales para las parasitosis digestivas son los copromicroscópicos (flotación, sedimentación, migración larvaria, realización de coprocultivos). En los últimos años se han incorporado algunas técnicas inmunoenzimáticas y otras basadas en la biología molecular, con objeto de incrementar las posibilidades del diagnóstico de los diferentes agentes parasitarios que afectan al ganado equino (Proudman y Trees, 1996b; Kaye *et al.*, 1998; Gasser *et al.*, 2004; Traversa *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2010; McWilliam *et al.*, 2010; Ionita *et al.*, 2010; Bohórquez *et al.*, 2011).

a) Técnicas coprológicas



Fig. 13. Toma de muestras fecales del recto del caballo.

El examen de las heces se utiliza para el diagnóstico no sólo de parásitos del tracto gastrointestinal, sino también de aquellos que se encuentran en otras partes del cuerpo, y que eliminan huevos o larvas que pasan por el aparato digestivo, por ejemplo, cuando al toser el caballo deglute larvas de los nematodos pulmonares (O'Meara y Mulcahy, 2002).

Como se puede observar en la figura 13, las muestras de heces deben recogerse directamente del recto, con objeto de evitar su contaminación fundamentalmente con nematodos de vida libre. Es aconsejable procesar las heces con prontitud, y cuando no sea posible, deberán de conservarse refrigeradas, o en formol tamponado al 4-8%, para impedir que algunos estadios como los huevos continúen su evolución y dificulten su identificación, o que las heces puedan contener larvas de moscas no parásitas (Francisco, 2007).



Fig. 14. Presencia de formas parasitarias en heces de caballos.

El examen macroscópico de la materia fecal permite comprobar su consistencia, color, presencia de sangre, moco, etc., y sobre todo la presencia de algunos parásitos o porciones de ellos o sus larvas que pueden ser detectados a simple vista, como proglotis de cestodos, hembras de oxiúridos, pequeños y grandes estróngilos y larvas de gasterófilos (Meana *et al.*, 2005) (Fig. 14).

Se han descrito numerosas formas de procesar las muestras, desde simples extensiones hasta laboriosas técnicas cuantitativas, pero las más utilizadas siguen siendo las recomendadas por el *Central Veterinary Laboratory de Weybridge* (MAFF, 1987).

La técnica de sedimentación se aplica para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* ya que los huevos de este parásito tienen mayor densidad que los restos vegetales que se hallan en las heces, lo que permite concentrarlos en el sedimento tras repetidos lavados para eliminar los detritus (Fig. 15). Para cuantificar el número de huevos por gramo de heces se utilizan cámaras McMaster. El burro es el équido más susceptible de padecer la infección por este trematodo (Vargas *et al.*, 2001).

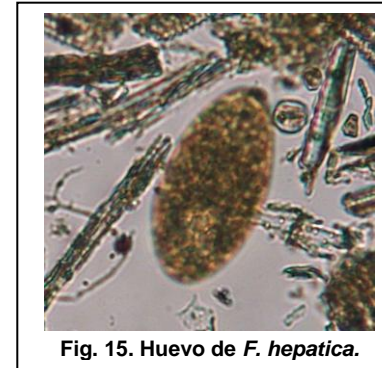


Fig. 15. Huevo de *F. hepatica*.

Basada en la utilización de soluciones de alta densidad en las que flotan las formas parasitarias, con la técnica de flotación se pueden observar ooquistes de protozoos, huevos de cestodos y la mayoría de los huevos de nematodos. Se recomienda la solución saturada de cloruro sódico o la de sacarosa ($\rho=1.3$). Los recuentos de huevos se hacen con cámaras McMaster cuando se utiliza NaCl como solución de flotación. No conviene olvidar que las soluciones densas en contacto con las formas parasitarias provocan su deformación, colapso e incluso el hundimiento de los huevos, por lo que el tiempo de procesado de la muestra debe de ser breve.



Fig. 16. Huevo de *Anoplocephala*.

Aunque el examen coprológico es muy específico para el diagnóstico de las cestodosis, debido a la morfología característica de los huevos de *Anoplocephala* (Fig. 16), en raras ocasiones son eliminados de forma individual, lo que provoca que no se distribuyan de forma uniforme en la masa fecal (Morgan *et al.*, 2005). De este modo, pueden pasar desapercibidos, por lo que resulta importante, como se mencionó anteriormente, el examen macroscópico previo a la realización de la flotación para el diagnóstico de cestodos.

De la comparación de 3 métodos copromicroscópicos para el diagnóstico de *A. perfoliata*, Meana *et al.* (1998) demostraron que los mejores resultados se coseguían con una combinación de 2 métodos de sedimentación/flotación. No se pudo establecer la relación entre la carga parasitaria y la detección de huevos, y se concluyó que cuando los caballos tenían menos de 100 cestodos no se conseguía un buen diagnóstico de infección por métodos coprológicos.

Utilizando como solución de flotación NaCl se detectan en las heces de los caballos parasitados huevos del nematodo *P. equorum* (Fig. 17), principalmente en los potros, aunque existen diferentes estudios que demuestran la eliminación de huevos en animales adultos (Francisco *et al.*, 2011b). En los potros infectados por *P. equorum* la presencia de huevos en heces suele cursar con enteritis catarral que provoca diarrea fétida y pálida, acompañada de malestar general, debilidad y pelaje áspero (Rieder *et al.*, 1995).



Fig. 17. Huevo de *P. equorum*.



Fig. 18. Huevo de nematodos gastrointestinales.

Pese a que con la flotación se evidencian huevos de estróngilos, no es posible la identificación de géneros o especies debido a la similitud morfológica que presentan (Fig. 18). Por este motivo se recurre a la realización de coprocultivos, que consiste en la incubación de muestras fecales durante 15-20 días a 20-25°C para estimular el desarrollo hasta larvas 3, aunque la diferenciación de los distintos géneros entre sí requiere un adiestramiento específico, y en numerosas ocasiones sólo es posible llegar hasta el género (Chapman *et al.*, 2001; Lichtenfels, 2008).

Debido a que las hembras adultas de *Oxyuris equi* depositan los huevos en la región perianal, éstos no se observan con frecuencia en los exámenes rutinarios de las heces por flotación (Fig. 19), y por ello el diagnóstico de este parasitismo se basa en la identificación de huevos de *O. equi* en preparaciones realizadas con cintas de papel adhesivo (Pereira y Vianna, 2006). Se presiona un trozo de la cinta limpia alrededor del ano, se retira y se coloca en un portaobjetos, para su posterior examen microscópico en busca de huevos con un opérculo o tapón en un extremo.



Fig. 19. Huevo de *O. equi*.

Las técnicas copromicroscópicas resultan de indudable utilidad para el diagnóstico de parasitismos gastrointestinales. Existen algunos inconvenientes entre los que destacan una reducida sensibilidad (Slocombe, 2004), ineficacia en la detección de algunas infecciones como la habronemosis gástrica (Traversa *et al.*, 2004), la imposibilidad de aplicación en parasitismos en los que no se eliminan formas parasitarias en las heces como en la gasterofilosis, o la incapacidad para llegar a un diagnóstico etiológico en infecciones por estróngilos.

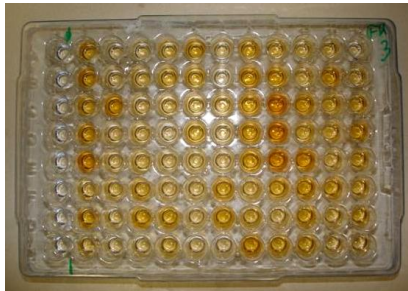
Con objeto de mejorar la detección de cestodosis equinas, se ha recomendado el tratamiento de los animales sospechosos y análisis de las heces recogidas a las 24-48 horas (Slocombe, 2006; Elsener y Villeneuve, 2011), consiguiéndose aumentar la sensibilidad del 62% antes del tratamiento al 100% después, posiblemente debido a que el antihelmíntico provoque la desintegración de los cestodos muertos, permitiendo así aumentar la excreción y dispersión de los huevos.

En ausencia de otras posibilidades, también se ha indicado la administración de antihelmínticos para la observación de estróngilos adultos y larvas de *Gasterophilus* en caballos (Kuzmina *et al.*, 2005; Kornaś *et al.*, 2007; Gökçen *et al.*, 2008).

Se han realizado algunos intentos para incrementar la fiabilidad de estas técnicas mediante la introducción de ciertas modificaciones. Una de ellas consiste en la recogida de toda la materia fecal excretada por los equinos 3 días antes del tratamiento antiparasitario y 3 días después (Dawson, 2003). El procesamiento de las heces consiste en introducirlas en bolsas de nylon de un tamaño de 50 x 50 cm y 10 µm de diámetro de poro, que se sellan y se colocan en una lavadora convencional y se someten a un ciclo en frío. Finalizado éste, se recoge todo el contenido retenido en las bolsas, y se observa microscópicamente la presencia de adultos de *Anoplocephala*, *Gasterophilus* y *Oxyuris*.

Para incrementar la sensibilidad de las técnicas copromicroscópicas, Cringoli (2006) diseñó el sistema FLOTAC[®], que consiste en realizar flotación en una centrífuga, seguido de la traslación de la porción apical a la suspensión en flotación. Esta técnica permite la cuantificación de huevos, larvas, ooquistes y quistes en una muestra de 1 g de heces (Utzinger *et al.*, 2008).

b) Procedimientos inmunológicos



El diagnóstico clínico no es sencillo ni concluyente. La coprología resulta barata, fácil de realizar y no precisa de equipos sofisticados ni de mantenimiento costoso, pero a veces no resuelve el problema del diagnóstico de los parásitos gastrointestinales de equinos. Con la aplicación de algunas técnicas inmunoenzimáticas se ha contribuido de modo importante a la detección de ciertas infecciones parasitarias.

Algunas pruebas de diagnóstico inmunológico están disponibles comercialmente, basadas en la detección de anticuerpos específicos en suero sanguíneo. Las técnicas más utilizadas son la aglutinación en látex, inmunofluorescencia indirecta y el ensayo de inmunoenzimas (ELISA, *enzyme linked-immunosorbent assay*).

Se han desarrollado investigaciones basadas en la obtención de antígenos de diferentes formas parasitarias. De la comparación de los productos metabólicos y somáticos de adultos de *Anoplocephala perfoliata*, se concluyó que sólo los de excreción/secreción eran útiles para el diagnóstico de **cestodosis equinas** (Höglund *et al.*, 1995), llegando a alcanzar una sensibilidad del 68% y especificidad del 95% (Proudman y Trees, 1996a).

Las técnicas inmunoenzimáticas también se han aplicado al estudio de la respuesta inmunitaria en caballos frente a **ciatostómidos**, comprobándose mediante antígenos de excreción/secreción que los anticuerpos disminuyen a las 6 semanas después de la infección de los equinos (Kara, 1996).

En base a los resultados obtenidos, en algunas experiencias se ha optado por purificar los antígenos parasitarios, en aras de perfeccionar las técnicas inmunoenzimáticas orientadas a la búsqueda de anticuerpos. De este modo, se aisló una proteína de 12/13 kDa de los antígenos de excreción/secreción de *A. perfoliata*, y se estableció que si las densidades ópticas eran superiores a 0'6 existía infección activa en los equinos (Trotz-Williams *et al.*, 2008). En trabajos recientes se ha demostrado que con esta técnica es posible establecer el número aproximado de cestodos adultos en función de las densidades ópticas obtenidas mediante ELISA (Morgan *et al.*, 2005), destacándose que este procedimiento resulta adecuado en caballos con elevada carga parasitaria y por ello en riesgo de enfermedad. Por el contrario, Traversa *et al.* (2008) afirmaron que con esta proteína no se podría alcanzar un diagnóstico fiable, puesto que 7 caballos negativos a la flotación y PCR resultaban positivos con la técnica inmunoenzimática.

Se ha comprobado que el diagnóstico de ciatostominosis larvaria se puede realizar con ELISA y 2 proteínas de 20 y 25 kDa obtenidas de los antígenos somáticos de dichas larvas (Dowdall *et al.*, 2003, 2004). De este modo, se consigue apreciar un incremento en la respuesta inmunitaria IgG total a las 5-7 s.p.i., que se correlaciona con la presencia de infección activa en los équidos.

Para hacer posible el diagnóstico de ciatostominosis larvaria equina, se ha expresado una proteína recombinante de 25'6 kDa cuya utilidad ha sido demostrada en técnicas ELISA (McWilliam *et al.*, 2010).

Tras fraccionar los antígenos de excreción/secreción de larvas 3 de ciatostómidos en un sistema de cromatografía líquida a baja presión (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*), se purificaron 3 complejos proteicos de 51, 29 y 15 kDa con los que se obtuvieron valores elevados (>90%) para la sensibilidad y especificidad, demostrándose asimismo un incremento significativo de las absorbancias 4 semanas antes de la aparición de huevos en las heces (Paz-Silva *et al.*, 2011a).

El diagnóstico de gasterofilosis equina se ha mejorado considerablemente con la puesta a punto de una prueba ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus intestinalis* y *G. nasalis*, que parece idónea para la estimación de la seroprevalencia de esta miasis *in vivo* (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).

La detección de anticuerpos frente a los antígenos de diferentes formas parasitarias, aunque supone un gran avance en el diagnóstico y control de un gran número de enfermedades, no siempre se puede correlacionar con la infección activa, y la información aportada sólo indica la exposición previa a los parásitos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2002; Kania y Reinemeyer, 2005). Otro fenómeno a tener en cuenta es el de la respuesta inmunitaria cruzada que se desarrolla frente a antígenos de

diferentes formas parasitarias, incluso alejadas filogenéticamente, y que complica la interpretación de los resultados obtenidos con las técnicas inmunoenzimáticas (Romasanta *et al.*, 2003). A estos inconvenientes habría que sumar la variabilidad entre los individuos, y la incapacidad de respuesta frente a cambios recientes experimentados en el hospedador en relación con su estado parasitológico (tratamientos, re-exposición a los parásitos) (Traversa *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el diagnóstico de otras parasitosis (Duménigo *et al.*, 1999; Paz-Silva *et al.*, 2002, 2003), se ha desarrollado una prueba para la detección de antígenos de *A. perfoliata* en heces de caballos (coproantígenos), concluyéndose que presenta una gran utilidad y aplicabilidad para establecer infección activa, al tiempo que hace posible discernir si equinos que presentan cólico u otros padecimientos intestinales tienen cestodos, y determinar las opciones más adecuadas para su tratamiento (Kania y Reinemeyer, 2005).

c) Detección de ácidos nucleicos

Pese a que no se utilizan de forma rutinaria y generalizada para el diagnóstico, las técnicas de biología molecular suponen una gran contribución para el control de las enfermedades parasitarias, puesto que tienen mayor sensibilidad que otros procedimientos como la coprología o el ELISA, indican la presencia de infección activa, y hacen posible la identificación de las especies de parásitos que afectan a los équidos (Bowles *et al.*, 1995; Klei, 2000; Van Herwerden *et al.*, 2000), lo que permite solucionar los problemas derivados de otras técnicas como es el caso de la identificación de las diferentes especies de ciatostomas a partir de las características morfológicas de las larvas 3 (Dowdall *et al.*, 2002).

Los primeros ensayos para la detección de ácidos nucleicos consistieron en la puesta a punto de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), que se aplicó al diagnóstico de cestodosis y strongilosis (Gasser *et al.*, 2004; Hodgkinson, 2006). La visualización de los productos de ADN se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa, y posteriormente se emplearon también geles de acrilamida (Traversa *et al.*, 2008).

Con objeto de favorecer la utilización de estos procedimientos, se han aplicado diferentes técnicas para el *revelado* de los productos de PCR, destacando por su empleo en el estudio de ciatostómidos la *reverse line blot*. Mediante la extracción de ADN de larvas de un grupo de ciatostómidos, esta técnica ha permitido identificar de forma simultánea 13 especies, diferenciándolas de las 3 especies de *Strongylus* spp. que pueden afectar a los caballos (Traversa *et al.*, 2007). Partiendo de huevos de estróngilos eliminados en las heces de equinos parasitados, también se han obtenido resultados exitosos (Ionita *et al.*, 2010). Esta prueba fue concluyente en la detección de infecciones por cestodos *Anoplocephala* y nematodos *Habronema* y *Draschia* (Traversa *et al.*, 2004, 2008).

Otra posibilidad desarrollada consiste en la utilización de técnicas inmunoenzimáticas para la detección de ácidos nucleicos de parásitos, siendo la PCR-ELISA la variante más conocida. Se han diseñado oligonucleótidos específicos de 4 especies de ciatostómidos (*Cylicocyclus asworthii*, *Cyc. nasatus*, *Cylicostephanus longibursatus* y *Cys. goldii*) (Hodgkinson *et al.*, 2001).

En ocasiones se ha empleado la *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) para el diagnóstico de criptosporidiosis equina (Burton *et al.*, 2010), que combina la amplificación de fragmentos de ADN parasitario con el análisis de la longitud de fragmentos con polimorfismo.

La técnica conocida como *real-time quantitative PCR* (PCR a tiempo real) constituye una posibilidad muy interesante para el diagnóstico de infecciones parasitarias, puesto que permite su detección cualitativa y cuantitativa (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2002). De este modo, se asocia la cantidad de ADN a la intensidad parasitaria (carga parasitaria). La detección de los ácidos nucleicos mediante fluorescencia (*Fluorescence real-time quantitative PCR*) supone un avance muy importante, ya que evita el revelado por electroforesis (Nielsen *et al.*, 2008).

Pese a todos estos avances, existen opiniones acerca de la imposibilidad de estimar la carga parasitaria que afecta a los caballos con técnicas moleculares, lo que impide conocer su estado parasitológico. En las cestodosis se asume que esto sólo se puede conseguir con pruebas inmunoenzimáticas (Traversa *et al.*, 2008).

d) Diagnóstico post-mortem

Resulta evidente que no se utiliza de forma rutinaria y generalizada para el diagnóstico, aunque supone una gran contribución para el conocimiento de las enfermedades parasitarias y su control, puesto que tienen mayor sensibilidad que procedimientos como la coprología o el ELISA, indican la presencia de infección parasitaria en el momento de la toma de muestras, y hacen posible la identificación de las especies de parásitos que afectan a los équidos (Hodgkinson *et al.*, 2005; Traversa *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008).

El examen de los caballos sacrificados permite la identificación de ejemplares de parásitos adultos y de fases larvares en órganos y vísceras (Fig. 20). Aunque hoy en día se dispone de técnicas de detección laboratorial *in vivo*, el diagnóstico fiable de algunas parasitosis como las cestodosis larvares es mediante la realización de la necropsia del animal, (Benton y Lyons, 1994; Williamson *et al.*, 1998; Meana *et al.*, 2005). Lo mismo sucede para el diagnóstico de habronemosis gástrica (Traversa *et al.*, 2006).

El análisis post-mortem de las diferentes vísceras y órganos de los equinos sacrificados permite la obtención de parásitos adultos, que se identifican más fácilmente que las larvas 3 desarrolladas en los coprocultivos.



Fig. 20. Necropsia de caballos.

2.4.- IMPORTANCIA DE LOS PARASITISMOS GASTROINTESTINALES EN CABALLOS

Como ya se advirtió en el apartado 2.3. (cfr. p. 15), el número de trabajos sobre algunas infecciones parasitarias en ganado equino no es elevado, y prácticamente se limitan a los helmintos, en especial nematodos gastrointestinales y cestodos. Por este motivo, este capítulo de revisión se ha centrado en estos dos grupos. Otra salvedad a tener en cuenta es que hasta hace algunos años la mayoría de las investigaciones se realizaban mediante la **necropsia** de los animales.

2.4.1. Prevalencia de infección por helmintos gastrointestinales

En la Tabla 1 se recogen los porcentajes de infección por helmintos (cestodos y nematodos) en caballos de diferentes países. Se alude a estos parasitismos porque son los más frecuentemente diagnosticados, independientemente del área geográfica.

Tabla 1.- Distribución de la prevalencia de endoparásitos en caballos según el país de origen.

País	Cestodos	Nematodos		
		Ascáridos	Estrongílicos	Oxiúridos
España				
Barrio Crespo (1976)		18%	25%	
Meana <i>et al.</i> (2005)	24%			
Francisco <i>et al.</i> (2009a)	1%	5%	94%	3%
Alemania				
Epe <i>et al.</i> (2004)	1'4%	1%	37%	0'04%
Slocombe (2006)	13%			
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2009b)		2-16%	50%	
Francia				
Slocombe (2006)	34%			
Gran Bretaña				
Coles y Rhodes (2005)			24%	
Rehbein <i>et al.</i> (2007)		24%	100%	
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2009b)			61%	
Comer <i>et al.</i> (2006)	16%			
Morgan <i>et al.</i> (2005)	52%			

Como se puede apreciar, los parásitos más prevalentes en caballos de todo el mundo son los estrongílicos, que alcanzan porcentajes de infección entre 24 y 100%.



Los ascáridos oscilan entre el 2 y el 24% (Tabla 1).



Tabla 1.- Distribución de la prevalencia de endoparásitos en caballos según el país de origen (cont.).

País	Cestodos		Nematodos		
			Ascáridos	Estrongílicos	Oxiúridos
Grecia					
Sotiraki <i>et al.</i> (1997)				44%	
Italia					
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2009b)				56%	
Ucrania					
Slivinska (2006)				100%	100%
Kuzmina <i>et al.</i> (2006)				100%	
Etiopía					
Fikru <i>et al.</i> (2005)		17%		93%	2%
Sudáfrica					
Davies y Schwalbach (2000)				90%	
Canadá					
Slocombe (2006)	52%				
Estados Unidos					
Martin-Downum <i>et al.</i> (2001)		5%		76%	
Lyons <i>et al.</i> (2006)		10-46%			
Brasil					
Pereira y Vianna (2006)				100%	
Australia					
Mfitilodze y Hutchinson (1989)	32%	15%			26%
Mfitilodze y Hutchinson (1990)				98%	
Bucknell <i>et al.</i> (1995)	29%	5%		95%	4%
Nueva Zelanda					
Slocombe (2006)	26%				

El porcentaje de caballos parasitados por cestodos varió entre el 1'4% y el 52%.




Destaca la prevalencia de oxiuros en los equinos de Ucrania (100%), puesto que en el resto de países se detectaron valores reducidos (0'04 a 3%).




Dentro de los estrongílicos, en algunas investigaciones se ha diferenciado entre grandes estrongilos y ciatostómidos (Tabla 2), e incluso se ha llegado a la identificación de ciertas especies de ciatostómidos. Se puede apreciar que desde hace algunos años los ciatostómidos han constituido el objeto de la mayoría de los estudios acerca de los estrongilos de caballos, en gran parte debido a la campaña agresiva que se desarrolló frente a los grandes estrongilos (Döpfer *et al.*, 2004).

Tabla 2.- Principales especies de pequeños y grandes estrongilos identificados en caballos de diferentes países.

<i>País</i>	<i>Ciatostómidos</i>	<i>Grandes estrongilos</i>
España		
Francisco <i>et al.</i> (2009a)	<i>Cyathostomum</i> <i>Poteriostomum</i> <i>Gyalocephalus</i> spp	
Alemania		
Slocombe (2006)	<i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Cyathostomum catinatum</i>	
Francia		
Collobert-Laugier <i>et al.</i> (2002)	<i>Cyathostomum coronatum</i> <i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicocyclus insigne</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Poteriostomum imparidentatum</i> <i>Cyathostomum labiatum</i> <i>Cylicocyclus ultrajectinus</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>Cylicostephanus minutus</i>	
Gran Bretaña		
Traversa <i>et al.</i> (2009)	<i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>Cylicocyclus goldi</i> <i>Cyathostomum pateratum.</i>	

Como se puede comprobar en esta tabla, de las 52 especies de ciatostómidos identificadas (Lichtenfels *et al.*, 2008), los géneros más prevalentes son *Cyathostomum*, *Cylicocyclus*, *Coronocyclus*, *Cyathostomun*, *Poteriostomum* y *Gyalocephalus* (Osterman Lind, 2005; Corning, 2009).

Tabla 2.- Principales especies de pequeños y grandes estróngilos identificados en caballos de diferentes países (cont.).

<i>País</i>	<i>Ciatostómidos</i>	<i>Grandes estróngilos</i>
Grecia		
Teodoridis <i>et al.</i> (1999)	<i>Cyathostomum</i> (42%) <i>Cylicostephanus</i> (24%) <i>Gyalocephalus</i> (22%) <i>Poteriostomum</i> (12%)	<i>Triodontophorus sp</i> (42%) <i>Strongylus equinus</i> (29%) <i>Strongylus edentatus</i> (21%) <i>Strongylus vulgaris</i> (6%)
Italia		
Traversa <i>et al.</i> (2007, 2009)	<i>Coronocyclus labiatus</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>Cyathostomum pateratum</i> <i>Cylicocyclus ashworthi</i> <i>Cylicocyclus goldi</i> <i>Cylicocyclus insigne</i> <i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i>	
Polonia		
Slivinska (2006) Kornaś <i>et al.</i> (2007, 2010)	<i>C. pateratum</i> (13'8%) <i>Cylicocyclus nassatus</i> (22%) <i>C. leptostomus</i> (8'2%) <i>C. insigne</i> (17'7%) <i>Cylicostephanus longibursatus</i> (9'1%) <i>Cyathostomum catinatum</i> (31'7%) <i>Coronocyclus coronatus</i> (31'7%) <i>Cylicostephanus calicatus</i> (24'4%) <i>C. ashworthi</i> (19'5%)	<i>Strongylus vulgaris</i> (80'5%) <i>S. equinus</i> (9'8%) <i>S. edentatus</i> (4'9%) <i>Triodontophorus serratus</i> (19'5%) <i>T. brevicauda</i> (7'3%)
Portugal		
Madeira de Carvalho <i>et al.</i> (2007)	<i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cyathostomum catinatum</i>	<i>Strongylus vulgaris</i>

Es importante hacer notar que como ya se citó con anterioridad, existe cierta controversia en la adscripción de los géneros *Triodontophorus*, *Craterosthomum* y *Oesophagodontus* a las subfamilias Strongylinae o Cyathostominae, que se puede comprobar en su clasificación en ambos grupos dependiendo de los autores de la investigación.

Tabla 2.- Principales especies de pequeños y grandes estróngilos identificados en caballos de diferentes países (cont.).


País	Ciatostómidos	Grandes estróngilos
Rumanía		
Ionita <i>et al.</i> (2010)	<i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>Cylicostephanus minutus</i>	<i>Strongylus</i>
Suecia		
Osterman Lind <i>et al.</i> (2007)	<i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cyathostomum catinatum</i>	
Ucrania		
Kuzmina y Kharchenko (2008)	<i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>C. ashworthi</i> <i>C. leptostomum</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>C. pateratum</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>C. longibursatus</i> <i>C. goldi</i> <i>C. minutes</i> <i>Coronocyclus coronatus</i> <i>C. labiatus</i>	
Etiopía		
Kharchenko <i>et al.</i> (2009)	<i>Cylicocyclus asini</i> <i>C. auriculatus</i> <i>Cyathostomum tetracanthum</i> <i>Cylindropharynx brevicauda</i>	
Sudáfrica		
Matthee <i>et al.</i> (2004)	<i>Cyathostomum</i> <i>Cylicocyclus</i> <i>Cylicostephanus</i>	
Estados Unidos		
Lyons <i>et al.</i> (2001)		<i>Strongylus vulgaris</i> 23% <i>Strongylus edentatus</i> 19%

Tabla 2.- Principales especies de pequeños y grandes estróngilos identificados en caballos de diferentes países (cont.).


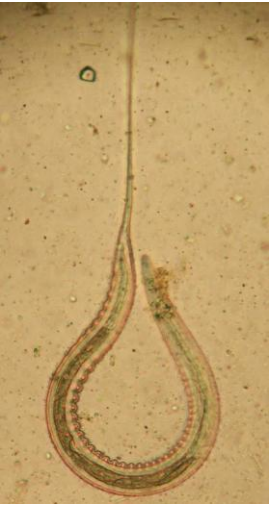
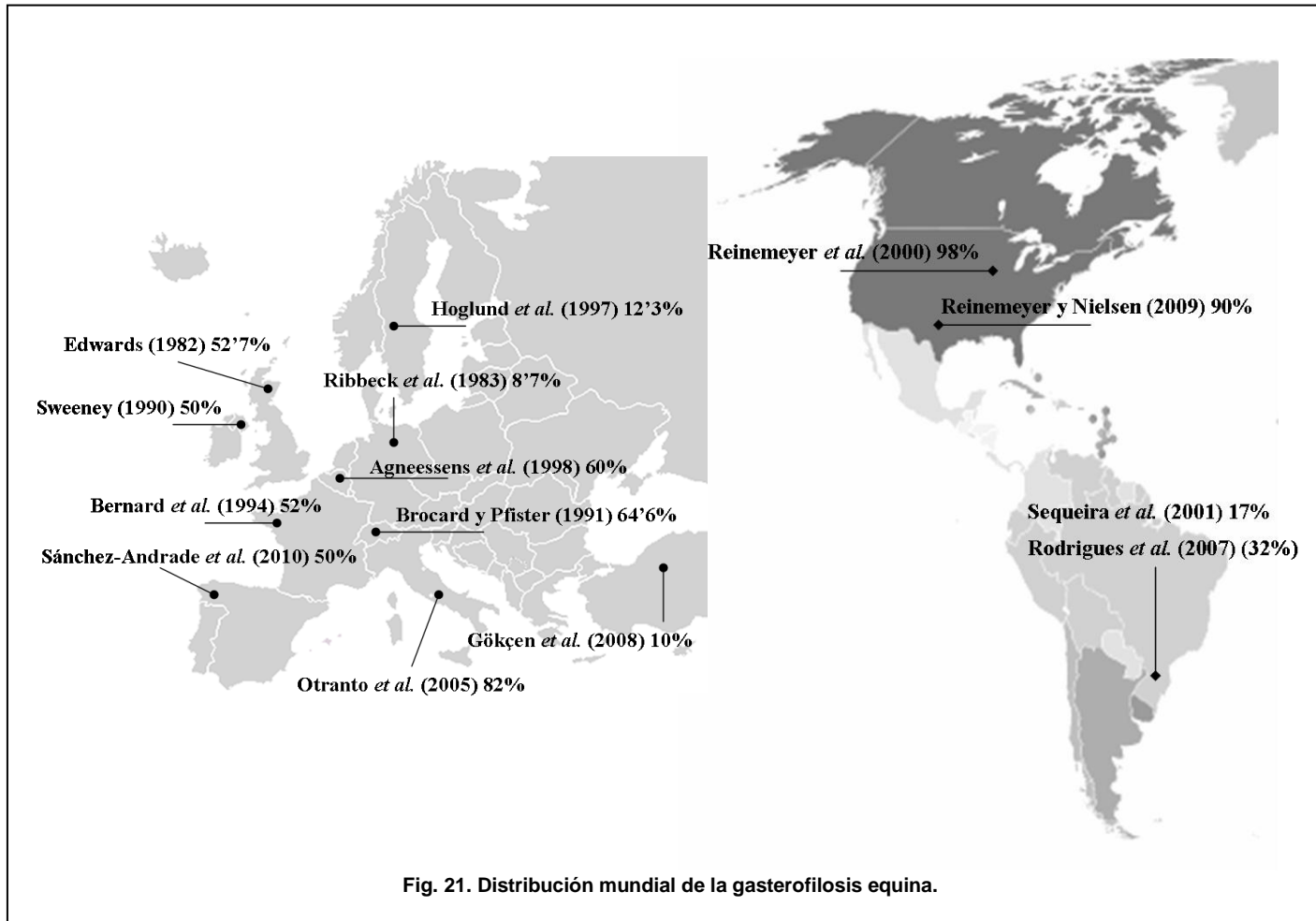
País	Ciatostómidos	Grandes estróngilos
Estados Unidos		
<p>Cleale <i>et al.</i> (2006)</p>	<p><i>Cyathostomum</i> spp (100%) <i>Cylicocyclus</i> spp (100%) <i>Gyalocephalus capitatus</i> (22'2%) <i>Poteriostomum</i> spp (33'3%)</p>	<p><i>Strongylus edentatus</i> (47%) <i>Strongylus vulgaris</i> (61%) <i>Triodontophorus</i> (69%)</p>
<p>Kuzmina <i>et al.</i> (2011)</p>	<p><i>Cylicocyclus ashworthi</i> <i>Cylicostephanus bidentatus</i> <i>Cylicostephanus hybridus</i></p>	
Brasil		
<p>da Silva Anjos <i>et al.</i> (2006)</p>	<p><i>Cyathostomum tetracanthum</i> <i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicostephanus minutus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus leptostomus</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>Cylicostephanus goldi</i></p>	
<p>Cutolo <i>et al.</i> (2011)</p>	<p><i>Coronocyclus ulambajari</i> <i>Craterostomum acuticaudatum</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>Cyathostomum pateratum</i> <i>Cylicocyclus brevicapsulatus</i> <i>Cylicocyclus insigne</i> <i>Cylicocyclus leptostomum</i> <i>Cylicocyclus nassatus</i> <i>Cylicocyclus ultrajectinus</i> <i>Cylicocyclus</i> spp. <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus poculatus</i> <i>Poteriostomum imparidentatum</i> <i>Triodontophorus</i> spp.</p>	

Tabla 2.- Principales especies de pequeños y grandes estróngilos identificados en caballos de diferentes países (cont.).

País	Ciatostómidos	Grandes estróngilos
<p>México</p> <p>Güiris <i>et al.</i> (2010)</p>	<p><i>Coronocyclus coronatum</i> <i>C. labiatus</i> <i>C. labratus</i> <i>Cyathostomum tetracanthum</i> <i>Cylicocyclus insigne</i> <i>C. leptostomus</i> <i>Cylicodontophorus bicoronatus</i> <i>Cylicostephanus asymetricus</i> <i>C. bidentatus</i> <i>C. minutes</i> <i>C. longibursatus</i> <i>Petrovinema poculatum</i> <i>Poteriostomum imparidentatum</i> <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Tridentoinfundibulum gobi</i> <i>Triodontophorus serratus</i> <i>T. tenuicollis</i></p>	<div data-bbox="1294 296 1742 612" data-label="Image"> </div> <p><i>Strongylus vulgaris</i> <i>S. equinus</i> <i>S. edentatus</i></p>

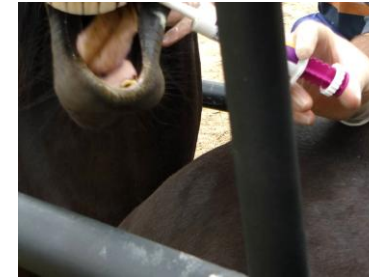
2.4.2. Prevalencia de infección por Gasterophilus spp.

Con frecuencia en mataderos de caballos se encuentran larvas de gasterófilos. De las 8 especies conocidas de *Gasterophilus*, sólo 3 aparecen en regiones con clima oceánico, *G. intestinalis*, *G. nasalis* y *G. hemorroidalis* (Agneessens *et al.*, 1998). Recientemente, se ha diseñado un ELISA con antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus* que ofrece una gran ventaja para el diagnóstico *in vivo* de gasterofilosis (Cortiñas *et al.*, 2010). En la figura 21 se representa la prevalencia de gasterofilosis en Europa y América. A excepción de los datos del Noroeste peninsular (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010), todos los estudios recogen datos obtenidos en la necropsia de caballos.



2.5.- CONTROL DE LAS PRINCIPALES PARASITOSIS DEL GANADO EQUINO

En la introducción de este estudio se explicó que el control parasitario en los caballos se centra casi exclusivamente en la administración de tratamientos farmacológicos. En un estudio realizado en el Noroeste de España se demostró que en el 59% ($n= 133$) de las explotaciones de ganado equino se administraban antihelmínticos (Francisco, 2010), en coincidencia con investigaciones llevadas a cabo en Australia, Italia o Suecia (Soulsby, 2007; Osterman Lind *et al.*, 2007; Edward y Hoffmann, 2008; Corning, 2009).



2.5.1. Fármacos antiparasitarios empleados en caballos

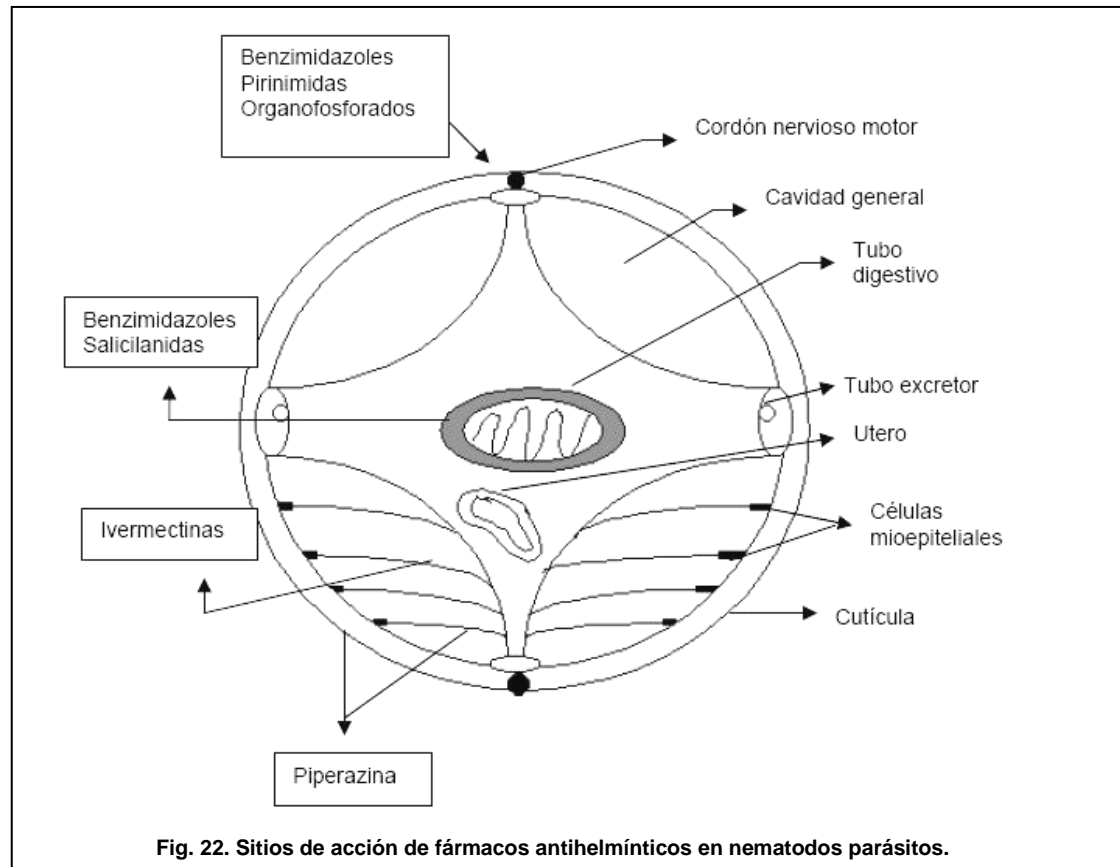
Hoy en día existen fármacos de actividad antiparasitaria con un amplio espectro, y elevada eficacia con una sola aplicación. Es importante tener en cuenta que la observación de un cuidadoso programa rotacional de antiparasitarios diseñado de acuerdo a la situación particular de cada explotación, es la opción más adecuada para asegurar la desparasitación eficaz (Reinemeyer y Courtney, 2001).

Los antiparasitarios más utilizados en ganado equino se clasifican en 4 grupos:

- 1) Bencimidazoles: presentan una actividad rápida y eficaz frente a pequeños y grandes estróngilos, ascáridos y oxiúridos. En los caballos, los benzimidazoles eliminan el 90-100% de los estróngilos adultos, pero su eficacia es menor frente a larvas 3 y 4, por lo que puede ser necesaria la administración de dosis elevadas y repetidas para combatir las fases migratorias de estos nematodos. En este grupo se encuentran el oxibendazol, fenbendazol y albendazol.
- 2) Sales de pirantel: en formulaciones de pamoato y tartrato. El pamoato de pirantel elimina grandes estróngilos, oxiúridos, ascáridos y varios géneros de ciatostómidos. Una dosis oral única de 13'2 mg de pirantel base por kilogramo tuvo una eficacia del 98% frente a *A. perfoliata* pero esta no es la dosis autorizada (Craig *et al.*, 2003).
- 3) Lactonas macrocíclicas: provocan la parálisis de nematodos y larvas que provocan miasis, como los gasterófilos. Las más empleadas son ivermectina y moxidectina, y más recientemente doramectina, abamectina, eprinomectina y aversectina. Desde los años 80 se viene utilizando la *ivermectina*, un derivado de la abamectina producto del hongo *Streptomyces avermectilis*. Se excreta principalmente por la bilis, al igual que la moxidectina, desde donde son vehiculadas hacia el intestino y eliminadas bajo su forma activa a través de las heces (Pérez *et al.*, 2001). En Galicia se administran estos antiparasitarios al 63% de los caballos bajo control parasitológico (Francisco, 2010).


- 4) Praziquantel: tiene una marcada actividad contra cestodos. No está autorizado para su uso en monoterapia en caballos, se puede utilizar para infecciones por *Anaplocephala perfoliata* combinado con lactonas macrocíclicas y con otros antihelmínticos como febantel, pirantel o ivermectina. En el 21% de las granjas de caballos de Galicia que realizan control parasitario utilizan productos que cubren un espectro parasitario amplio (Francisco *et al.*, 2010).

En la figura 22 se recogen los puntos de actuación de los diferentes antihelmínticos empleados frente a nematodos parásitos.



En la Tabla 3 se resumen los antiparasitarios más empleados en los caballos y su principal espectro de acción.

Tabla 3.- Fármacos de uso frecuente en la desparasitación de caballos.

					
	Cestodos	Ascáridos	Estróngilos	Oxiúridos	Gasterófilos
Bencimidazoles		+	+	+	
Sales de pirantel		+	+	+	
Lactonas macrocíclicas		+	+	+	+
Praziquantel	+				

Hasta la fecha, la única vía de administración de antiparasitarios que cuenta con registro legal es la *oral*, en formato de *pasta*, procedimiento de difícil aplicación en caballos salvajes por el estricto grado de inmovilización del animal que se requiere. En el Noroeste de la Península Ibérica se comprobó que la vía más empleada para la administración de antiparasitarios a caballos era la oral (72%), seguida por inyectable (22%), *pour on* (4%) y mixta (2%) (Francisco, 2010).

2.5.2. Guía para la elección de un antiparasitario equino

Para elegir el antihelmíntico adecuado deben observarse ciertos criterios. Como no existe un esquema válido para todas las situaciones, es necesario realizar una adaptación a cada caso particular, teniendo en cuenta en especial el *tipo de explotación* y la *aptitud de los caballos*.

Cuando se trata de ejemplares de difícil manejo, con poco valor económico y con un régimen de vida que presupone elevado riesgo de infección parasitaria, como puede ser el caso de los caballos que se mantienen en régimen de silvopastoreo (por ejemplo los equinos autóctonos PRG), es preciso encontrar un modo de desparasitación que cumpla las siguientes características (Gayrard *et al.*, 1999; Sánchez, 2008):



Fácil aplicación: constituye un factor determinante, dado que como ya se ha mencionado con anterioridad, la inmovilización es una tarea complicada, y aunque en ocasiones se cuente con una manga en la que los caballos tienen limitados sus movimientos, ha de procurarse que la administración del antiparasitario sea breve y no les provoque estrés, difícil de conseguir si se emplea la vía oral o la inyectable. Es importante destacar que los animales *salvajes* sometidos a estrés pueden tardar un tiempo en retornar a su estado normal, que podría repercutir en la re-constitución de los rebaños, reduciendo sus posibilidades de supervivencia frente a depredadores como el lobo.

Bajo coste económico: junto con el anterior punto, son la base de la desparasitación de los caballos en silvopastoreo y en general de aquellos ejemplares de reducido valor económico. Los caballos en silvopastoreo son los menos desparasitados en Galicia (1-2 veces/año), apuntándose como causa probable la dificultad del manejo de estos animales, especialmente en cuanto a su inmovilización, para la que se hace necesaria muchas personas que inviertan una importante cantidad de tiempo cuando se trata de manadas grandes, lo que supone un notable coste económico (Francisco *et al.*, 2009b). En los últimos años la mayoría de los caballos de monte se desparasitan en verano coincidiendo con fiestas o reuniones populares conocidas como *A rapa das bestas*, mediante la administración tópica de ivermectina.

Amplio espectro: cualidad deseable aunque difícil de alcanzar debido a los diferentes parasitismos que pueden afectar a los caballos. Poniendo atención en la Tabla 3 resulta sencillo comprender que el control parasitario es posible si se emplea una mezcla de lactonas macrocíclicas y praziquantel, eficaz frente a cestodos, nematodos y gasterófilos, los principales endoparásitos detectados en equinos en silvopastoreo (Francisco *et al.*, 2009b). El principal inconveniente reside en que esta formulación sólo se puede administrar por vía oral.

Elevada persistencia en el animal: condiciona la eficacia de la quimioterapia así como la duración del efecto antiparasitario. La mayoría de los estudios en este sentido se han dirigido a las lactonas macrocíclicas, demostrándose que ivermectina y moxidectina mantienen valores por encima de la dosis letal 50 (DL₅₀) durante los 30 días posteriores a su administración por vía oral o inyectable (Pérez *et al.*, 2002).

2.5.3. Eficacia de antiparasitarios

Inicialmente, la eficacia de quimioterapia antiparasitaria se evaluaba mediante el *critical test*. Desde hace años se han incorporado diferentes procedimientos como el *fecal egg count reduction test* (FECRT) o la determinación del *egg reappearance period* (ERP). Finalmente, algunas de las técnicas inmunoenzimáticas y moleculares aplicadas al diagnóstico etiológico de infecciones parasitarias también se han empleado en la valoración de la eficacia de fármacos antiparasitarios. En la Tabla 4 se recogen los resultados de investigaciones desarrolladas en todo el mundo para determinar el efecto de diferentes fármacos frente a los helmintos que afectan al ganado equino.

Tabla 4.- Eficacia del tratamiento antiparasitario en caballos.

	Principio activo	Ascáridos	Estróngilos		Cestodos
		FECR	FECR	ERP (semanas)	FECR
Mirck (1985)	Pirantel	>95%	>95%		
Davies y Schwalbach (2000)	Fenbendazol Ivermectina Moxidectina Doramectina Pirantel		81% 100% 100% 100% 96'1%		
Bairden <i>et al.</i> (2001, 2006)	Moxidectina		96-100%		
Mercier <i>et al.</i> (2001)	IVM + PZQ Moxidectina		100% 100%	8 9	
Chandler y Love (2002)	Moxidectina		100%	17	
Boersema <i>et al.</i> (2002)	Ivermectina Moxidectina	87% >96%			
Klei <i>et al.</i> (2001)	Ivermectina	100%	100%		
Matthee (2003)	Moxidectina Ivermectina Pirantel		100% 96% 99%		
Slocombe (2004)	Pirantel				96'6%
Marchiondo <i>et al.</i> (2004)	Pirantel				97%
Steinbach <i>et al.</i> (2006)	Fenbendazol		100%		
Cleale <i>et al.</i> (2006)	Moxidectina	>90%	>90%		

Tabla 4.- Eficacia del tratamiento antiparasitario en caballos (cont.).

	Principio activo	Ascáridos	Estróngilos		Cestodos
		FECR	FECR	ERP (semanas)	FECR
Osterman Lind <i>et al.</i> (2007)	Fenbendazol Ivermectina Pirantel		86% >99% 99%	- 5 8	
Schougaard y Nielsen (2007)	Ivermectina Pirantel	70% 97%	99% 99%		
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2007)	Ivermectina	>95%			
Slocombe <i>et al.</i> (2007)	Fenbendazol Ivermectina Moxidectina Pirantel	100% 33'5% 47'2% >97%			
Kuzmina y Kharchenko (2008)	Albendazol		69%		
Lindgren <i>et al.</i> (2008)	Fenbendazol Ivermectina Pirantel	100% 147% 100%			
Lyons <i>et al.</i> (2008)	Fenbendazol Oxibendazol Ivermectina Pirantel		0% 0% 100% 12%		
Francisco <i>et al.</i> (2009b)	Ivermectina	100%	100%	8	100%
Veronesi <i>et al.</i> (2009)	Ivermectina Pirantel	71-73% 100%			
Francisco (2010)	Fenbendazol Pirantel Ivermectina Moxidectina Doramectina	100% 100%	94% 100% 96% 89%	5 5 5	
Cutolo <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina		99%		
Larsen <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina	97%	100%	4	
Näreaho <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina Pirantel	52%	79% 43%		
Francisco <i>et al.</i> (2011b)	Ivermectina Moxidectina		100% 100%	6 6	

a) Critical test

El protocolo estándar consiste en administrar un tratamiento antiparasitario a los caballos y recoger las heces y examinarlas durante los 7 días previos a la necropsia (Drudge *et al.*, 1963). Se trata de una prueba que determina el espectro de actividad, eficacia del tratamiento, patrón de descarga y condición física de cada especie de los parásitos (Drudge y Lyons, 1977).

Consideraciones éticas al margen, el principal inconveniente de este método es que cuanto más tiempo transcurre entre la desparasitación y la necropsia, se incrementa el número de parásitos muertos, destruidos, o fragmentados, lo que dificulta su hallazgo, necesario para calcular la eficacia.

Como solución a este problema, se ha propuesto una modificación por la que sólo transcurre un día entre el tratamiento y la necropsia de los animales, para evitar que los parásitos sean eliminados con las heces (Lyons *et al.*, 1986, 1989). En este caso no se recogerían muestras fecales, asumiéndose que algunos parásitos podrían ser expulsados antes de la necropsia.

Recientemente se ha planteado otra modificación, según la cual se recogen heces (cada 6 horas) que se procesan por las técnicas copromicroscópicas, hasta las 48 horas previas a realización de la necropsia (Owen y Slocombe, 2004).

En la actualidad resulta bastante difícil de comprender la necesidad de sacrificar animales para la evaluación de programas de quimioterapia, por ello, esta técnica ha quedado prácticamente en desuso, y se han desarrollado otros métodos *in vivo* a tal fin.

b) Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) o Prueba de la reducción de la eliminación fecal de huevos

Es el método más empleado para determinar *in vivo* la eficacia de antiparasitarios en caballos, ovejas y vacas (Kaplan, 2002; Coles *et al.*, 2006), y actualmente es el único aceptado para los equinos. Presenta algunas limitaciones, que incluyen la variabilidad de los datos del recuento de huevos en heces, y que pueden provocar una relativa inconsistencia de la prueba (Uhlinger, 1993; Miller *et al.*, 2006).

Factores como inmunidad a diferentes edades (Klei y Chapman, 1999) y diferencias en el manejo en pastoreo (Döpfer *et al.*, 2004) provocan una mayor variabilidad entre los recuentos fecales de huevos en caballos que en ganado ovino o vacuno. Actualmente es el procedimiento recomendado por la *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP, Asociación Mundial para el Desarrollo de la Parasitología Veterinaria), y consiste en comparar la eliminación de huevos antes y a los 10-14 días post-tratamiento, calculándose así el porcentaje de reducción (Kaplan, 2004):

$$\text{FEER (\%)} = [1 - (\text{FEC}_{\text{post-tratamiento}} / \text{FEC}_{\text{pretratamiento}})] \times 100$$

Según la WAAVP, es necesario calcular la media y la varianza de eliminación de huevos antes y después del tratamiento, así como la reducción media y el intervalo de confianza (al 95%, IC95%) (Coles *et al.*, 1992). Se considera que un parasiticida es eficaz cuando el FECR alcanza valores $\geq 95\%$, y se duda de su eficacia si se encuentra entre 90-95% y el IC95% está por debajo del 90%.

Aunque se han propuesto métodos estandarizados (Wood *et al.*, 1995), se emplean diferentes protocolos de evaluación (con y sin grupos testigo) y de cálculo, considerando la media aritmética (Dash *et al.*, 1988; Coles *et al.*, 1992) o geométrica (Presidente, 1985; Wood *et al.*, 1995). Por estos motivos, y pese a sucesivos intentos, no se ha llegado a un acuerdo unánime todavía para definir las condiciones de eficacia de quimioterapia en parásitos de caballos.

c) Egg Reappearance Period (ERP) o Periodo de reaparición de huevos en heces

En los últimos años se ha intentado completar el estudio de la eficacia de los antiparasitarios mediante la introducción de otros parámetros como el tiempo de reaparición de los huevos en las heces de los caballos después del tratamiento (ERP) (Trawford *et al.*, 2005; Lyons *et al.*, 2007; Reinemeyer, 2009).

Hace diez años, Sangster (1999) propuso que el acortamiento del ERP podría ser un primer signo de resistencia a antihelmínticos. En los últimos cinco años se ha encontrado reducción del ERP al desparasitar caballos con ivermectina en EEUU (Lyons *et al.*, 2008), Brasil (Molento *et al.*, 2008) y Europa (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007). Pese a todo, la interpretación de estos hallazgos se complica por la ausencia de consenso en la definición del ERP.

Algunos estudios consideran el ERP como la semana del primer recuento positivo de huevos tras la quimioterapia (Little *et al.*, 2003; Dudeney *et al.*, 2008; Lyons *et al.*, 2008; Molento *et al.*, 2008). Otros han utilizado el periodo necesario para la reaparición de una cantidad determinada de huevos, mediante la estimación de un punto de corte *fijo* basado en la media de eliminación de huevos, por ejemplo 100 ó 200 huevos por gramo de heces (hpg) (Jacobs *et al.*, 1995; Boersema *et al.*, 1996; Mercier *et al.*, 2001). Finalmente, una tercera definición consiste en emplear el FECRT para calcular las eficacias semanalmente, y después emplear el 80% (Tarigo-Martinie *et al.*, 2001) o el 90% (Boersema *et al.*, 1995; Borgsteede *et al.*, 1993; von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007) de la eficacia como valor de punto de corte.

d) Porcentaje de caballos positivos

En nuestra opinión este parámetro resulta de indudable utilidad en combinación con los anteriormente señalados, pero su estimación es infrecuente (Francisco *et al.*, 2009b, 2011a, b):

$$\text{PCP (\%)} = [1 - (\text{caballos positivos}_{\text{post-tratamiento}} / \text{caballos positivos}_{\text{pretratamiento}})] \times 100$$

e) Efecto sobre la eclosión de huevos y el desarrollo de larvas

En algunas investigaciones se ha aplicado la prueba de eclosión de huevos (EHA, *egg hatch assay*) (Cirak *et al.*, 2004; von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009a) e incluso la del desarrollo de larvas de nematodos (LDA, *Larval Development Assay*) (Osterman Lind *et al.*, 2005; Rojo y Meana, 2008).

Con el objetivo de incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos con el FECRT, se han probado técnicas basadas en estudiar el efecto de los antiparasitarios sobre la eclosión de huevos (EHA) o en su desarrollo hasta larvas 3 (LDA). Mientras que se ha comprobado una buena correlación entre los datos de FECRT, EHA y LDA en el estudio de la eficacia de los bencimidazoles, existen discrepancias cuando se analiza el efecto del levamisol (Maingi *et al.*, 1998). Craven *et al.* (1999) manifestaron que la correlación entre estas técnicas era pobre.

Si bien el LDA ofrece ventajas para evaluar la eficacia de diferentes fármacos de forma simultánea, no parece una técnica a emplear de forma rutinaria que pueda constituirse en alternativa del FECRT (Osterman Lind *et al.*, 2005).

f) Técnicas inmunoenzimáticas

El empleo de estos procedimientos, al igual que sucede con los anteriormente citados, discurre de forma paralela al del diagnóstico de infecciones parasitarias. Las técnicas de diagnóstico inmunoenzimáticas más empleadas se han orientado a la detección de anticuerpos específicos en suero sanguíneo, disponiéndose de pruebas de aglutinación en látex, inmunofluorescencia indirecta o enzimoimmunoensayo (Kara, 1996).

Se ha demostrado que en caballos infectados por *A. perfoliata*, el tratamiento con ivermectina y praziquantel redujo de forma significativa los niveles de anticuerpos frente a un antígeno de 12-13 kDa obtenido de cestodos adultos (Barrett *et al.*, 2004). Después de administrar un tratamiento a base de ivermectina + praziquantel a caballos que eliminaban huevos de este cestodo, los equinos resultaron negativos por las técnicas de flotación y PCR-anidada, en tanto que las absorbancias obtenidas por ELISA se mantuvieron elevadas al utilizar como antígeno productos de excreción-secreción brutos (Traversa *et al.*, 2008).

2.5.4. Población parasitaria refugia

El término *refugia* alude a aquellos estadios parasitarios que no han estado expuestos a la acción de fármacos antiparasitarios (Coles, 2002). Por ejemplo, las larvas en los pastos constituyen la mayoría de esta población (Nielsen *et al.*, 2007), pero también parásitos de animales que nunca han recibido quimioterapia y ciertos estadios larvarios que se encuentran dentro del hospedador, a los que no les afectan los antihelmínticos utilizados, como pueden ser las larvas inhibidas y enquistadas de ciatostómidos (van Wyk, 2001; Rojo y Meana, 2008).

El interés de esta población reside precisamente en que, ante esta ausencia de exposición a antiparasitarios, los *vermes refugiados* no se ven afectados por la presión de selección, y de este modo proporcionan una importante fuente de alelos susceptibles a los antiparasitarios. Parece por ello interesante mantener un porcentaje adecuado de población *refugia*, para que se diluya con los parásitos resistentes lo que se traduciría en la reducción y retraso de la aparición de resistencias. (Dobson *et al.*, 2001).

Por estas razones se ha sugerido la importancia de no tratar a los caballos cuando la población en *refugia* ha disminuido (invierno en climas fríos, veranos en climas cálidos). Debería tenerse más en cuenta la epidemiología de los parásitos que el simple tratamiento estacional sin conocer ni valorar la carga parasitaria, tanto dentro como fuera del hospedador (Nielsen *et al.*, 2007).

2.5.5. Problemas de la quimioterapia

a) Eficacia inferior a lo esperado. Resistencia

Del examen de la información recogida en la Tabla 4 se colige que, con el tiempo, la administración de algunos antiparasitarios ha proporcionado eficacias inferiores a las esperadas. Es necesario destacar que en lugar de referirse a estas situaciones como *eficacias reducidas*, se ha preferido emplear la nomenclatura de *resistencia a antiparasitarios*.

No es un problema sencillo de abordar si se tiene en cuenta toda la problemática asociada a la evaluación de la eficacia de quimioterapia antiparasitaria. La cuestión a plantear es la siguiente: si no es posible establecer el efecto de un tratamiento farmacológico, ¿cómo se puede llegar al extremo de identificar casos de resistencia (eficacia reducida)?

La revisión de las investigaciones llevadas a cabo en caballos muestra a nuestro juicio un afán cuasi desmedido en el hallazgo de fallos en la quimioterapia, dedicándose más atención y esfuerzo a este fin que al de sentar las bases de un criterio unánime con el que definir la eficacia de los tratamientos, y con ello la reducción de esta eficacia, y la resistencia. Tampoco se ha enfocado el problema desde un punto de vista pluricausal en el que intervienen diferentes factores como el principio activo del fármaco, género/especie parasitaria, manejo de los equinos, frecuencia de desparasitación, vía de administración del antiparasitario y su farmacocinética.

Este panorama, lejos de resolverse, parece perpetuarse en el tiempo, como lo muestra la aplicación de técnicas novedosas como las moleculares en la identificación de poblaciones de parásitos resistentes a determinados grupos de antiparasitarios.

A la dificultad de establecer la eficacia de un tratamiento hay que unir la del diagnóstico e identificación correcta de parásitos resistentes. Se ha empleado una combinación de las técnicas ya mencionadas como el FECRT, EHA, LDA, *southern blot*, e incluso análisis de ácidos nucleicos mediante PCR alelo-específica, pero hasta la fecha no se ha podido desarrollar una técnica

que mediante su única aplicación permita detectar resistencia frente a bencimidazoles, lactonas macrocíclicas, pirantel, praziquantel, etc.

Acorde a los enunciados de la WAAVP, en ganado ovino y caprino hay *resistencia* si el FECRT es <95%, y el límite inferior del intervalo de confianza <90% (Coles *et al.*, 1992), en tanto que se refiere a *sospecha* si sólo se cumple uno de los casos. Sin embargo, para los caballos sólo se hace mención a resistencia frente a bencimidazoles si la eficacia es <90% (Kaplan, 2004), valores que no se emplean o aceptan por todos los investigadores; incluso se ha llegado a clasificar el resultado del tratamiento en *eficaz* si el resultado del FECRT supera el 90%, *dudoso* si se encuentra entre el 80 y el 90%, e *ineficaz (resistencia)* si desciende del 80%.

La administración repetida de un antihelmíntico o de antihelmínticos de la misma familia, y la administración de dosis subterapéuticas, favorecen el desarrollo de subpoblaciones o “cepas” resistentes a los tratamientos, y su utilización prolongada propicia que se perpetúe en las siguientes generaciones. La resistencia es un carácter transmisible (Kwa *et al.*, 1995), por lo que se podría suponer que si la población parásita resistente no se vuelve a exponer al antihelmíntico, al cabo de varias generaciones volvería a ser susceptible; sin embargo, se ha observado que las poblaciones parásitas resistentes a los bencimidazoles lo son de forma persistente (Jackson y Coop, 2000).

Se considera que la resistencia a los antihelmínticos es un fenómeno preadaptativo: los genes que la confieren ya están presentes en la población aunque con una frecuencia baja, antes del tratamiento antihelmíntico. La *aparición* de una cepa resistente se produce tras la eliminación de todos los nematodos susceptibles, lo que significa que en la siguiente generación predominará la descendencia de la minoría resistente (Nielsen *et al.*, 2010).

Nielsen *et al.* (2007), consideran que la resistencia a antihelmínticos es consecuencia biológica y natural del tratamiento, y que parece irreal asumir que se pueda evitar completamente. Estos autores proponen ciertas estrategias, en particular la reducción de la frecuencia de tratamiento y el mantenimiento de la población *refugia* como medidas de presión selectiva para retrasar su aparición.

2.5.6. Terapia selectiva

A pesar de la disponibilidad de parasiticidas eficaces, existen diferentes aspectos relacionados con la desparasitación de caballos que podrían reducir su eficacia esperada. La ausencia de análisis periódicos para comprobar el estado parasitológico de los equinos antes o después de la quimioterapia, la desparasitación sólo de individuos de elevado valor económico o cuando el examen visual revela pérdida de la condición corporal atribuible a infección parasitaria (Francisco *et al.*, 2011a).

Klei en 1996 ya insistió en que para mejorar la eficacia del tratamiento, la desparasitación de los caballos debería de realizarse únicamente en las épocas del año de mayor riesgo que coinciden con el momento en el que los animales se encuentran más infectados. El mismo criterio sostienen Nielsen *et al.* (2006a, 2007), al añadir que se debería evitar tratar a los caballos cuando la intensidad de la infección disminuye, es decir, en los meses de invierno en regiones de climas fríos o verano si hablamos de zonas tropicales o con clima semejante, práctica que también contribuiría a aumentar la población en refugio.

Sin embargo, el concepto de *terapia selectiva* no se refiere a la época de desparasitación, sino a los caballos que se considera necesario tratar, y con este fin se han definido diferentes pautas. Borgsteede *et al.* (1993) establecieron este requerimiento cuando se producía un incremento de la eliminación de huevos en las heces superior al 10% con respecto al tratamiento anterior, mientras que Taylor y Kenny (1995) señalaron que se debe administrar un antiparasitario cuando el 50% de los caballos elimina más de 200 huevos por gramo de heces (hpg).

Otras opiniones se basan en la determinación de una cantidad fija de huevos excretados, que se ha establecido en 100 hpg (Boersema *et al.*, 1998), 200 hpg (Molento *et al.*, 2008), 300 hpg (Uhlinger, 1991; Nielsen *et al.*, 2010) ó 100-300 hpg (Elsener y Villeneuve, 2009).

Existen varios aspectos que se deberían tener en cuenta a la hora de aplicar la terapia selectiva con éxito. La elección de un punto de corte para el tratamiento frente a estróngilos se debate con frecuencia. Se ha demostrado que el aumento en la eliminación de 1 a 500 huevos se correlaciona significativamente con el incremento de la carga de parásitos adultos, mientras que a partir de 500 huevos por gramo de heces no existen diferencias (Nielsen *et al.*, 2010). Por otra parte, es preciso considerar que la mayoría de los estudios acerca de esta terapia se han desarrollado en países del norte de Europa, en los que se observan cifras de eliminación de huevos significativamente inferiores a las que se citan en otras regiones del Sur como España o Portugal (Francisco *et al.*, 2009c; Madeira *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2012), lo que indica que sería necesario tener en cuenta el área geográfica en la que se encuentran los caballos para establecer dicho valor de corte.

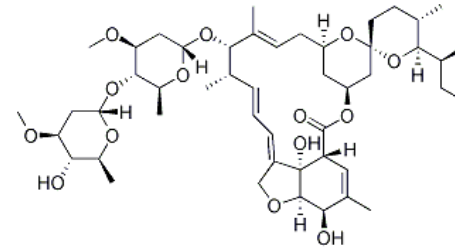
El principal objetivo de la terapia selectiva radica en la reducción del tratamiento y con ello de la presión selectiva sobre las poblaciones parásitas *resistentes*. No obstante, es imprescindible tener en cuenta que si se aplica esta terapia resulta imprescindible separar los animales, puesto que si se mantienen en los mismos pastos caballos con y sin tratamiento, el resultado final es la infección de todos los equinos (Francisco *et al.*, 2011b).

Tampoco se puede olvidar que la infección de los caballos se produce por la ingestión de forraje con larvas infectivas (L3), por lo que el control de estas infecciones basado únicamente en la quimioterapia no es suficiente, y se ha de tener en cuenta la acción sobre el medio para disminuir su presencia (Francisco, 2009; Paz-Silva *et al.*, 2011b).

2.6.- ADMINISTRACIÓN DE LACTONAS MACROCÍCLICAS

Las lactonas macrocíclicas son endectocidas que incrementan la permeabilidad de la membrana a los iones cloruro, provocando la hiperpolarización de nervios y fibras musculares y con ello la parálisis de los nematodos y de algunos ectoparásitos (Pemberton *et al.*, 2001). El efecto neto es la parálisis y la muerte del parásito diana. Se trata de compuestos con actividad selectiva puesto que algunos mamíferos no tienen canales Glu-Cl, y las lactonas presentan baja afinidad por ligandos de canales de Cloro.

Desde la introducción de la ivermectina (IVM) a comienzos de los años 80, se convirtió en una revolución en la terapia veterinaria gracias a su amplio espectro y elevada eficacia (Khalifa, 2006). La ivermectina en pasta o en líquido tiene un amplio espectro de actividad contra nematodos y artrópodos y se administra por vía oral a una dosis de 0'2 mg/kg de peso corporal. Los caballos toleran bien la administración oral de tres veces la dosis recomendada de ivermectina. Se puede utilizar en caballos de todas las edades, incluyendo yeguas en cualquier fase de la gestación y sementales de cría. Con la intención de hacer más segura y menos laboriosa su administración, se han probado diferentes métodos (inyectable, *pour on* y oral), y las formulaciones disponibles se intentan mejorar continuamente.



2.6.1. Lactonas macrocíclicas por vía tópica

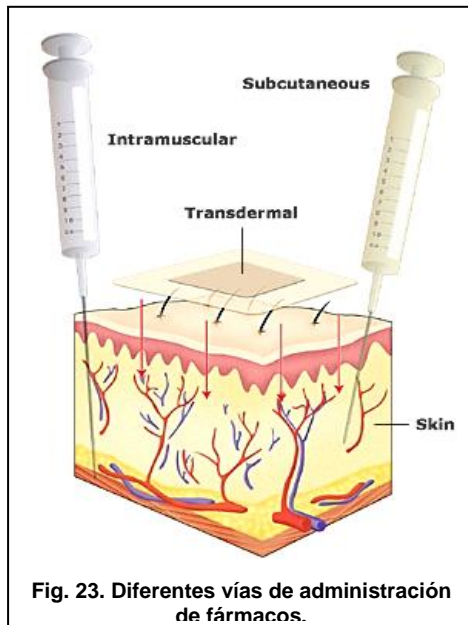


Fig. 23. Diferentes vías de administración de fármacos.

La piel es el órgano más grande del organismo, llegando a representar el 12-24% del peso corporal de un animal. Se trata de un tejido dinámico y en continua regeneración, que sirve de barrera protectora contra el medio, además de regular la temperatura corporal, producir pigmentos y vitamina D y permitir la percepción sensorial. Este órgano desempeña un papel en la regulación del equilibrio hídrico así como en la eliminación de ciertas toxinas (McKellar y Benchaoui, 1996).

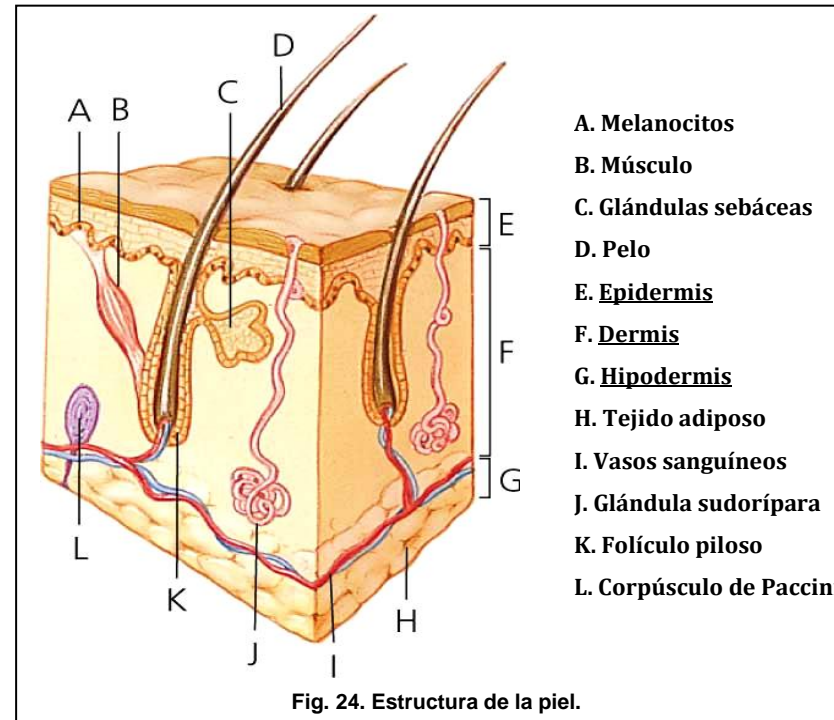
Algunas investigaciones han probado que los endectocidas causan ocasionalmente irritación local, inflamación o dolor en el punto de inyección cuando se administran vía subcutánea (Geurden *et al.*, 2003; Mavrogianni *et al.*, 2004; Gokbulut *et al.*, 2008). Por estas razones, la administración tópica ha reemplazado a la ruta inyectable en ganado vacuno. En el diseño de algunos medicamentos veterinarios aplicados *via tópica* se han añadido sustancias que aumentan la penetrabilidad de los principios activos, especialmente a nivel del estrato córneo, primera y principal barrera de la piel (Nielsen *et al.*, 2006b).

Las formulaciones tópicas de antihelmínticos reducen el riesgo de daño tanto para el operador como para el animal, y parecen particularmente convenientes para los ganaderos, que pueden aplicar el producto fácilmente (Hennessy, 1997), posibilidad que no ocurre en muchos países, en los que la administración de fármacos sólo puede ser realizada por profesionales veterinarios. Otra ventaja notable que se consigue mediante la vía tópica es la reducción significativa del tiempo necesario para la desparasitación de los animales, estimándose en 45 segundos/caballo, frente a los 5 minutos/caballo si se realiza por vía oral (Francisco *et al.*, 2011a).

2.6.2. Histología de la piel

La piel está formada por 3 capas, *epidermis*, *dermis* e *hipodermis*. La *epidermis* (E) es la capa superior, en contacto con el medio externo, y en los caballos presenta un grosor medio de 0'053 mm (Wong *et al.*, 2005). Se describen 4 estratos en la epidermis, basal, espinoso, germinativo y córneo.

En el estrato germinativo se produce continuamente la división celular, de modo que se van creando nuevas células que empujan a las viejas hacia la superficie donde forman un estrato endurecido e inerte que se renueva constantemente. Se ha demostrado que el tiempo que tarda en renovarse completamente la epidermis de los equinos es de 17 días (Spearman *et al.*, 1964). En esta capa se absorben los productos administrados por vía tópica.



La *dermis* (F) es una capa de tejido vivo que contiene numerosos capilares sanguíneos, glándulas sudoríparas y sebáceas, que producen lípidos encargados de la hidratación de la piel. En esta capa también se encuentran terminaciones nerviosas con receptores para las sensaciones de contacto, presión, calor, frío y dolor. Los folículos pilosos se originan en las porciones internas de la dermis. El grosor de la dermis de los equinos oscila entre 1 y 6 mm (3'8 mm de promedio) (Schummer *et al.*, 1981). Las áreas más gruesas están localizadas en el dorso (cabeza, mano, espalda, cola) mientras que las más delgadas están en el vientre (ubre, genitales) y superficies mediales de las costillas (Wong *et al.*, 2005).

Por último, la *hipodermis* o capa subcutánea de la piel (G) está compuesta principalmente por tejido conectivo laxo y adipocitos. Debido a su naturaleza grasa es la mayor reserva de energía del animal.

2.6.3. Factores relacionados con la farmacocinética de antiparasitarios vía tópica

La farmacocinética de los antiparasitarios depende principalmente de la vía de administración, formulación del principio activo y variaciones interespecíficas e interindividuales (McKellar y Benchaoui, 1996). Cuando se administran por una vía diferente a la intravenosa, es preciso que sean absorbidos, distribuidos y que alcancen una concentración eficaz en el punto de acción durante el tiempo suficiente para conseguir su efecto sistémico. Estos procesos guardan relación con la especie animal a la que se destina, están regulados por el ratio de disolución, la solubilidad del principio activo en una formulación en particular, la vía de administración y las propiedades físicoquímicas del antiparasitario (Lanusse y Prichard, 1993).

En la actualidad, las preparaciones tópicas de antiparasitarios están compuestas por levamisol, ivermectina o moxidectina, y sólo existen registros para su utilización en ganado vacuno (Dornbusch *et al.*, 2006). En rumiantes y suidos, se ha demostrado que la administración por vía tópica presenta la ventaja adicional de una elevada eficacia no sólo frente a los parásitos internos, sino también frente a los ectoparásitos.

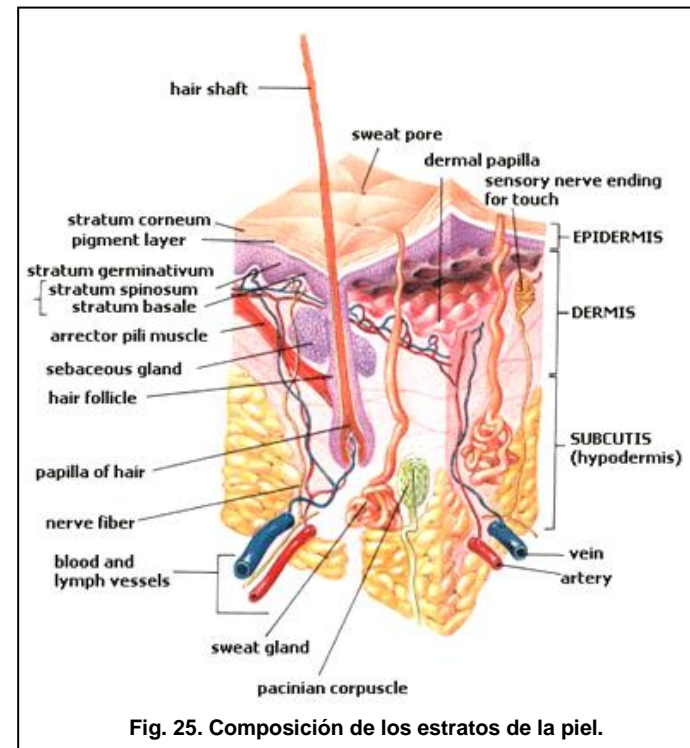
McKellar y Benchaoui (1996) probaron en vacas la administración de ivermectina (IVM) *pour on* y comprobaron que se alcanzaban concentraciones en sangre del principio activo similares a las obtenidas mediante la aplicación por vía oral. Gayraud *et al.* (1999) compararon los perfiles farmacocinéticos de doramectina e ivermectina en vacas tratadas por vía tópica, y determinaron que con la doramectina se lograban valores más elevados en plasma.

En ganado equino la IVM se comercializó al principio para su administración como inyectable intramuscular. Consistía en una formulación que contenía 20 mg de componente micelar por litro de solución acuosa (2% w/v). Con relativa frecuencia se observaban reacciones adversas después de la administración parenteral, por lo que a partir del año 1984 se redujo su utilización por esta vía y se desarrollaron otras presentaciones, como pasta oral en dióxido de titanio y propilenglicol dispensable en jeringas graduadas. También se comercializa para su administración mediante intubación nasogástrica en algunos países (Randi, 1984; Campbell, 1989).

Hoy en día la administración de ivermectina a los caballos se hace generalmente por vía oral. Se ha demostrado que una dosis de 0'2 mg kg p.v.⁻¹ tiene una eficacia del 95-100% frente a las formas larvianas y adultas de nematodos estróngilos, ascáridos, oxiúridos, gasterófilos y dictiocáulidos (Blagburn y Lindsay, 2001).

a) Diferencias en la piel según la especie animal

La absorción de medicamentos se produce a nivel del *estrato córneo de la epidermis*. Las diferencias que hay en las características de la piel de diferentes especies animales hacen que diversos estudios relacionados con la dermatología, farmacología cutánea y absorción percutánea hayan demostrado que resulta difícil extrapolar los datos de absorción de un producto de una especie a otra (Reinemeyer y Courtney, 2001). Después de comprobar que las concentraciones plasmáticas y disponibilidad sistémica de la ivermectina por vía tópica en caballos fueron inferiores a la obtenida por Laffont *et al.* (2001) en terneros, se apuntó que una de las razones podría consistir en las diferencias fisiológicas e histológicas en la estructura de piel y pelo. Entre las variables que se consideran más importantes en la absorción de fármacos se citan el grosor de la piel, la densidad folicular y la longitud del pelo (Riviere y Papich, 2001). Monteiro-Riviere *et al.* (2008) señalaron que la secreción de glándulas sudoríparas y sebáceas también era un factor a tener en cuenta, puesto que el sebo puede actuar como vehículo de endectocidas solubles en él.



Se ha demostrado que el grosor de la dermis varía de una especie animal a otra, siendo menor en los cánidos y mayor en los óvidos. En concreto, las ovejas de raza merina presentan la mayor tasa de penetración de medicamentos vía tópica.

A pesar de que se podría pensar que la menor disponibilidad plasmática de la ivermectina *pour on* en el caballo podría deberse a la diferencia de grosor de la piel de las diferentes especies, Meyer (2011, *comunicación personal*) afirmó que no existen diferencias considerables en el grosor de la dermis de caballos (45 μm) y de bovinos (25 μm). Sin embargo, en un estudio comparado del tegumento de animales domésticos mediante microscopía electrónica, Meyer y Neurand (1987) mostraron que en los rumiantes la dermis presenta una capa delgada de las terminaciones de las glándulas tubulares apocrinas directamente debajo de los folículos, motivo que parece favorecer que pueda ser atravesada fácilmente por el principio activo.

Meyer *et al.* (2008) expusieron que la densidad de vasos sanguíneos en la subepidermis era distinta en las diferentes especies de animales domésticos. La mayor irrigación sanguínea de la piel de los bovinos justifica para Riviere y Papich (2001) la mayor absorción por vía tópica de la ivermectina en bovinos.

La densidad folicular oscila entre 600 y 2500 pelos/cm² en los vacunos, y entre 1000-2500 pelos/cm² en los caballos (Meyer *et al.*, 2008), por lo que no se puede atribuir a este parámetro las diferencias en la absorción tópica de antiparasitarios en las 2 especies.

Cuando se aplica ivermectina *pour on* cierta cantidad se une físicamente al pelo en el punto de aplicación, también otra parte queda atrapada en la piel y precipita en el punto de aplicación de la superficie cutánea liberándose después de forma gradual, estas cantidades deben de tenerse en cuenta cuando se quiere conseguir una concentración sistémica concreta en un periodo de tiempo determinado. Gokbulut *et al.* (2010) sugieren que tras su administración tópica, la IVM está disponible en la superficie cutánea durante un periodo de tiempo más largo que si se hace oral, lo que probablemente proporciona una mayor persistencia de eficacia para los ectoparásitos en los caballos.

b) Composición del principio activo

Las avermectinas son moléculas producidas por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*. La ivermectina es una mezcla de dos avermectinas modificadas químicamente que contiene al menos el 80% de 22,23-dihidroavermectina-B1a y >20% 22,23-dihidroavermectina-B1b. La farmacocinética y actividad de la ivermectina depende de muchos factores entre los que se incluyen, la especie animal, vía de administración, el vehículo utilizado en la formulación comercial, peso, condición corporal, estado fisiológico, y la cantidad y el tipo de nutrición, por lo que resulta difícil extrapolar datos de una especie a otra.

Es una sustancia altamente lipofílica que se disuelve en la mayoría de disolventes orgánicos, pero es prácticamente insoluble en agua, lo que favorece que se absorba lentamente en el punto de inyección y como consecuencia se prolonga su presencia en la sangre (Lanusse *et al.*, 1997; McKellar, 1997).

La solubilidad acuosa de una molécula activa puede afectar su biodisponibilidad, que depende de la relación de la proporción y extensión del principio activo absorbido desde el punto de aplicación al flujo sanguíneo (Baggot y McKellar, 1994). Aunque el espectro antiparasitario y la eficacia de diferentes moléculas endectocidas son similares, pueden presentar diferencias en propiedades fisicoquímicas como la cinética, potencia y persistencia de la actividad antiparasitaria (Lifschitz *et al.*, 2004), así como en la compatibilidad con los excipientes para la formulación.

El excipiente (vehículo) de las formulaciones farmacéuticas puede desempeñar un papel importante en su absorción desde el punto de administración y biodisponibilidad (Lo *et al.*, 1985; Lanusse *et al.*, 1997; Lifschitz *et al.*, 2004). En relación con la aplicación de medicamentos por vía tópica, se ha ideado la utilización de *transportadores transdérmicos* para ayudar a su penetración. Se trata de moléculas que interactúan con los componentes de la piel aumentando la fluidez de las membranas lipídicas de las células y del estrato córneo, incrementando así la penetración del producto a través de la piel (Reinemeyer y Courtney, 2001).

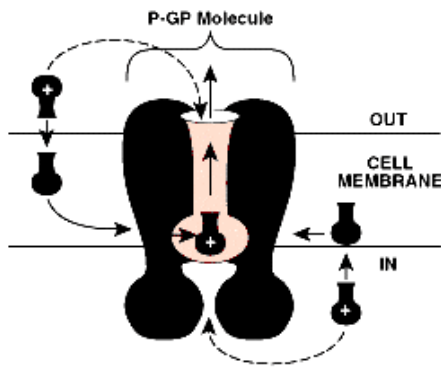
El transportador transdérmico ideal debe reunir las siguientes características:

- 1.- Farmacológica y químicamente inerte.
- 2.- Potencia y actividad específica en la piel.
- 3.- Efectos reversibles.
- 4.- No irritante, no sensibilizante e hiporreactivo.

En medicina veterinaria, la primera molécula que se empleó con este fin fue el DMSO (*dimetil-sulfóxido*). Se sigue empleando con elevada frecuencia en la clínica equina, no sólo por su elevada actividad anti-inflamatoria, sino también como vehiculador de medicamentos a nivel transdérmico, por lo que se utiliza en problemas articulares en caballos de deporte.

c) Factores fisiológicos

No existe conocimiento preciso de los factores fisiológicos que controlan la absorción de fármacos en los caballos, y la escasa información disponible alude mayoritariamente a la administración oral. En caballos que recibieron doramectina por vía oral se llegó a la conclusión de que el factor fisiológico más importante para la absorción del fármaco en el intestino delgado es el



grado de vaciado gástrico (Pérez *et al.*, 2010). En esta línea, Gokbulut *et al.* (2010) afirmaron que la dieta podría influir en la farmacocinética de ivermectina *pour on*, observando mejores resultados cuando los caballos pastaban durante las 4 horas siguientes a la desparasitación, que cuando se mantienen estabulados y alimentados a base de cebada y paja de trigo. Por el contrario, estudios previos indicaron que un nivel elevado de ingestión de comida puede reducir la absorción y biodisponibilidad de IVM administrada vía oral (Taylor *et al.*, 1992; Gokbulut *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que el caballo ingiere alimento de forma continuada, y el pequeño tamaño de su estómago, resulta lógico considerar que se vacía con frecuencia (Baggot, 1992). De este modo, parece probable que la mayor parte de la superficie del tracto gastrointestinal de los equinos favorezca la absorción de los antiparasitarios (Pérez *et al.*, 2010).

En algunos estudios se ha señalado la intervención de la P-glicoproteína (P-gp) en la disponibilidad de lactonas macrocíclicas administradas por vía oral o intraruminal en ganado vacuno (Lifschitz *et al.*, 2006; Ballent *et al.*, 2007). De modo similar a una bomba de vacío, P-gp reconoce y excreta los fármacos que penetran la membrana de una célula. Una vez que el producto entra en la célula, es detectado y expulsado por la proteína transportadora P-gp. Los puntos de unión de ATP para P-gp se extienden en la célula, donde se cree que proporcionan la energía necesaria para transportar los medicamentos a través de la membrana al exterior de la célula.

Se ha demostrado la presencia de P-gp en la membrana apical de los enterocitos del tracto gastrointestinal de caballos (Tydén *et al.*, 2009), que podría desempeñar un papel importante en la biodisponibilidad oral de fármacos mediante el bombeo de ciertos componentes desde el interior de los enterocitos, que de este modo retornarían al lumen intestinal (Martínez *et al.*, 2008). También se ha identificado P-gp en los hepatocitos de la superficie canalicular, donde promueven la excreción de metabolitos lipofílicos (Lecureur *et al.*, 2000), de modo que podría limitar la absorción de lactonas administradas por vía oral, al tiempo que promovería su secreción en la bilis, reduciendo así la disponibilidad sistémica.

Aunque ya se ha mencionado la ausencia de estudios, resulta bastante acertado destacar que la aplicación tópica de las lactonas contribuiría a eludir la participación de la P-gp.

d) Factores climáticos

Se han descrito algunas preocupaciones acerca de que la eficacia de las formulaciones tópicas podría modificarse ante algunas condiciones climáticas (lluvia). Sin embargo, los resultados de diferentes estudios demostraron que en ganado vacuno la exposición a la lluvia durante un periodo de tiempo breve antes o después del tratamiento no redujo la eficacia de IVM *pour on*, aunque se debe tener la precaución de no administrarla por esta vía a animales mojados (Rolfe *et al.*, 1997; Rehbein *et al.*, 1999).

2.6.4. Eficacia de la ivermectina administrada por vía tópica

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las lactonas macrocíclicas son productos derivados de microorganismos que se encuentran en el suelo. Entre las características más importantes cabe destacar la elevada absorción por vía oral, parenteral o tópica (Shoop *et al.*, 1995). Esta última vía resulta muy atractiva en animales que se mantienen en régimen extensivo o semi-extensivo, por la facilidad de administración (Dornbusch *et al.*, 2006).

La IVM ha sido la primera lactona macrocíclica introducida como antiparasitario veterinario en Francia en 1981. Se trata de uno de los endectocidas más investigados y empleados en animales. Normalmente se comercializa bajo formulación inyectable, *pour on* (vacuno) y oral (ovino, equino, caprino).

a) En caballos

Las empresas farmacéuticas desaconsejan el empleo de lactonas macrocíclicas en especies diferentes a aquellas para las cuales se han registrado, o a dosificaciones que no sean las recomendadas (McKellar y Benchaoui, 1996; Pérez *et al.*, 2010). La ivermectina (IVM) cuenta con un registro para su administración oral en caballos, pero existen evidencias de que se emplea sin licencia por vía tópica en diferentes países del mundo, como se puede comprobar en algunas páginas de internet (<http://www.horseadvice.com/horse/messages/5/156208.html>).

Por estas razones, casi no se han desarrollado ensayos para analizar la eficacia de ivermectina por vía tópica en caballos. Dornbusch *et al.* (2006) administraron ivermectina por vía oral y tópica a caballos del Brasil, empleando la dosis recomendada para el ganado vacuno ($0.2 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ y $0.5 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$, respectivamente). Mediante el recuento de huevos de estróngilos en las heces de los équidos, concluyeron que los mejores resultados se obtenían con la formulación oral, puesto que con la tópica no se consiguió una reducción significativa de la eliminación de formas parasitarias en las heces de los animales. Como posible solución apuntaron al incremento de la dosis empleada.

En un estudio desarrollado en caballos autóctonos PRG, Sánchez *et al.* (2009) obtuvieron una eficacia del 100% frente a nematodos ascáridos, strongílidos y oxiúridos al administrar una dosis de $1 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ ivermectina vía tópica.

Gokbulut *et al.* (2010) estudiaron la eficacia de IVM *pour on* (0.5 mg/kg) y vía oral o subcutánea (0.2 mg/kg), y comprobaron que existían diferencias en función de la vía de administración, obteniendo una vida media terminal superior con la primera. Los valores del *tiempo medio de permanencia* de la IVM también resultaron significativamente más prolongados con la administración tópica. Por el contrario, la disponibilidad plasmática de la lactona *pour on* resultó inferior a la oral, así como la reducción del recuento de huevos. Finalmente, la mayor persistencia en el pelo podría ser útil frente a ectoparásitos porque prolonga su eficacia, aunque también podría resultar en concentraciones plasmáticas subterapéuticas, y con ello incrementar el riesgo de resistencia a antihelmínticos.

2.6.5. Efectos indeseables de la administración tópica de antiparasitarios



a) Sobre los animales

Al contrario de lo que sucede con otras vías de administración como la subcutánea, que puede provocar inflamación o dolor en el punto de inyección, no son numerosas las investigaciones que analicen los inconvenientes de la aplicación tópica de antiparasitarios. En caballos desparasitados con IVM tópica se ha demostrado la ausencia de reacciones adversas sobre la piel o el pelo, como alopecia, depigmentación o úlceras (Francisco *et al.*, 2011a).

b) Sobre el medio

El interés por los estudios de la ecotoxicidad potencial de las lactonas macrocíclicas ha aumentado desde hace años. Tras su administración, cantidades importantes de ivermectina, doramectina o moxidectina son excretadas a través de la bilis y expulsadas con las heces al exterior, sobre todo durante las primeras semanas post-tratamiento (Lifschitz *et al.*, 1999, 2000).



Se ha dedicado especial atención en el análisis de las heces de diferentes especies animales después de aplicar lactonas por vía oral o subcutánea, con objeto de aclarar el posible efecto perjudicial sobre organismos coprófagos que contribuyen a la desintegración de las heces, como escarabajos y algunas moscas (Strong, 1992; Herd, 1995; Cook *et al.*, 1996). En concreto, se ha analizado en artrópodos la mortalidad de larvas y adultos, interferencia con la alimentación, retraso del desarrollo, oviposición y pupación reducida (Wall y Strong, 1987).



La administración de IVM ha resultado letal o subletal para muchos escarabajos coprófagos (Herd, 1995), afectando a la degradación de la materia fecal. Algunas investigaciones han puesto en evidencia que tras la aplicación por vía oral se alcanzaban mayores niveles de antiparasitario en heces que si se hacía por vía subcutánea (Suárez *et al.*, 2003).

En bovinos tratados con IVM subcutánea se observó una reducción de la colonización natural de la materia fecal por escarabajos y ácaros, atribuida a la demora en la degradación de las heces en el ambiente (Iglesias *et al.*, 2005). Esto supone una grave preocupación para las actividades agropecuarias, ya que ocasiona perjuicios económicos por el desaprovechamiento de áreas de pastoreo. Más aún, la reducción de las actividades coprófagas y de construcción de túneles favorece la persistencia de estiércol no degradado, que proporciona un ambiente adecuado para que moscas responsables de pestes completen su desarrollo, albergar nematodos parásitos del ganado, reducir el área de pastoreo disponible y limitar la incorporación de nitrógeno en las especies vegetales (Fincher, 1981).

Estudios realizados con doramectina han arrojado resultados similares (Floatel *et al.*, 2008). Por el contrario, los efectos adversos sobre el medio son menores cuando se emplea la moxidectina (Suárez *et al.*, 2009).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que la diversidad y abundancia de organismos coprófilos varían regionalmente. En regiones templadas, la actividad en la desaparición de las masas fecales está determinada por factores estacionales, con mayor presencia de insectos y anélidos en primavera y una representativa participación microbiana durante el otoño (Holter y Hendriksen, 1988). En base a que la población de artrópodos de invierno constituye el *reservorio* y la garantía de que estos organismos perduren en el medio, esta sería otra de las razones que desaconsejan la administración de tratamientos antiparasitarios en ciertas épocas del año, como el invierno, puesto que se conseguiría preservar la población de los organismos coprófagos, al tiempo que se mantendría la población *refugia*, como se comentó anteriormente.

A photograph of several horses of various colors (dark brown, chestnut, and bay) standing in a dense forest. The horses are partially obscured by thin tree trunks and thick undergrowth, including ferns and other green plants. The scene is brightly lit, suggesting a sunny day. The text "3. Unidad temática" is overlaid in the lower center of the image.

3. Unidad temática

Productividad, estabilidad y sostenibilidad son tres cualidades que caracterizan los agroecosistemas y que a menudo se encuentran en conflicto. Existen numerosas prácticas derivadas de la nutrición, genética o sanidad que apuntan a la productividad del sistema ganadero, y que podrían entrar en conflicto con su estabilidad.

En algunas regiones de España, en especial en el Norte, cada año aumenta la superficie de tierra que deja de cultivarse. Los prados de los que se alimentaba el ganado, y los terrenos de labradío en los que, en otros tiempos se cultivaban cereales y tubérculos, se han transformado en praderas naturales, monte bajo, eriales, matorrales, etc. A la merma económica que supone la improductividad de estas tierras, hay que añadir el grave riesgo que supone la elevada presencia de biomasa combustible para la aparición de incendios, el deterioro de los accesos a entornos naturales y el feísmo de un paisaje que se intenta promocionar para el turismo rural, por lo que estas áreas se convierten en desfavorecidas.

Al abandonar la actividad pecuaria, los propietarios han optado por la tenencia de animales dóciles y de *fácil manejo* (caballos, burros, ovejas o cabras) para mantener en buen estado prados de pequeña extensión, pero improductivos; la otra opción mayoritaria es la explotación forestal de terrenos muy extensos y otrora de labradío. Las administraciones públicas subvencionan esta actividad e indican las especies de árboles con las que está permitido repoblar, pero su productividad no se recoge hasta que transcurren 20-30 años. Las administraciones autonómicas también subvencionan la cría de algunas especies de animales autóctonos, pero el rendimiento obtenido es escaso y básicamente se ciñe a la ayuda recibida.

Desde hace algunos años resulta frecuente en montes y bosques del noroeste de España encontrar caballos de raza autóctona y sus cruces, que se alimentan a base de pastos silvestres, matorrales, etc. Este régimen de explotación resulta de indudable interés desde diversos aspectos, como la reducción de biomasa vegetal inflamable, contribuyendo a la prevención de incendios; la obtención de carne muy rica en proteínas y carente de grasas, por lo que la carne de potro se equipara con el precio de la carne de vacuno de máxima calidad; fomento del caballo en actividades de ocio y deporte, etc.

Al igual que sucede con otras especies animales, el mantenimiento de los caballos en extensivo puede facilitar la aparición de infecciones parasitarias como cestodosis, nematodosis o ectoparasitosis, frente a las cuales la única posibilidad de control prácticamente estriba en la administración de productos antiparasitarios.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó un PRIMER ESTUDIO con objeto de **conocer las principales endoparasitosis que afectan al ganado equino de Galicia en silvopastoreo**. Para ello, se tomaron muestras de heces de 483 equinos Pura Raza Galega en régimen de silvopastoreo, y de 72 caballos de esta raza que se mantenían estabulados. Se aplicaron las técnicas coprológicas de flotación, sedimentación y migración larvaria para identificar las posibles formas parasitarias en las heces de los caballos. También se realizaron coprocultivos con el propósito de identificar al menos a nivel de género los pequeños estróngilos.

La presencia de ooquistes, larvas o huevos de parásitos que se pone en evidencia en las heces gracias a algunos procedimientos coprológicos, se correlaciona con la existencia de formas parasitarias adultas, sobre todo en el aparato digestivo y sistema respiratorio de los hospedadores. Sin embargo, existen algunos parásitos que no son eliminados de forma rutinaria a través de las heces, como sucede con los ejemplares de *Gasterophilus* spp., responsable de miasis en équidos. Esto supone un inconveniente no sólo para el diagnóstico de la gasterofilosis equina, sino también para establecer la cronobiología de este parasitismo, clave para determinar las épocas más adecuadas en las que administrar tratamientos antiparasitarios.

Para solucionar este problema, se diseñó un SEGUNDO ENSAYO en el que se **estableció la cronobiología de la infestación por *Gasterophilus* en la Comunidad Autónoma Gallega**. Se examinó el pelaje de caballos para visualizar los huevos del parásito, y se analizó la presencia de larvas 3 en las heces de los animales. El trabajo se completó con el estudio de la respuesta inmunitaria humoral (IgG) mediante un procedimiento inmunoenzimático ELISA con antígenos de excreción/secreción obtenidos de larvas 2 de gasterófilos.

Resulta innegable que el control parasitario requiere un programa integrado en el que se ensartan las medidas sobre los hospedadores (fármacos de actividad antiparasitaria) y sobre el medio (rotación de pastos, roturado). La eficacia de la quimioterapia depende de diferentes factores, entre los que destaca el principio activo y su aplicabilidad, a los que hay que sumar su aplicación en las épocas más adecuadas.

Los antiparasitarios más empleados se administran por vía oral o parenteral (intramuscular, subcutánea), métodos que exigen una correcta inmovilización de los animales para asegurar la adecuada dosificación del producto. Los caballos Pura Raza Galega son animales salvajes y de extraordinaria agilidad y fuerza, lo que supone un notable contratiempo para su desparasitación mediante los procedimientos reseñados. En vista de estos antecedentes, se planteó un TERCER ESTUDIO con el que **conocer la eficacia de la aplicación *pour on* de ivermectina sobre los principales endoparásitos de los Pura Raza Galega**. Se emplearon 4 grupos de potros de 7 meses de edad, que recibieron 3 dosis diferentes de la lactona macrocíclica, manteniéndose un lote sin tratar como testigo. La eficacia del tratamiento se estableció con ayuda de la técnica coprológica de flotación; también se analizaron las variaciones de algunos parámetros séricos bioquímicos (nitrógeno ureico, creatina, calcio, proteínas totales, albúmina, globulinas) y enzimáticos (aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenada, fosfatasa alcalina, γ -glutamil transferasa).

En la valoración de la eficacia de la quimioterapia es importante tener en cuenta no sólo la desaparición de las formas parasitarias, sino también la duración de este efecto. De este modo es posible llegar a establecer si la acción del antiparasitario se dirige sólo frente a las formas adultas, o si además también afecta a los estadios inmaduros. Este aspecto resulta importante especialmente en el caso de los estróngilos, puesto que se trata de nematodos que una vez en el interior de los caballos, penetran en la mucosa intestinal y pueden permanecer en hipobiosis durante largos periodos de tiempo. En el CUARTO ENSAYO **se evaluó la eficacia y persistencia de un tratamiento *pour on* a base de ivermectina frente a nematodos en caballos PRG adultos en silvopastoreo**. Mediante flotación se examinó la presencia/ausencia de huevos de parásitos en las heces. El ensayo se ultimó con la valoración de las variaciones sanguíneas de algunos parámetros de las series celulares roja y blanca.

VOLUME 31, NUMBER 9, SEPTEMBER 2011
ISSN: 0737-0806

JOURNAL OF
EQUINE
VETERINARY
SCIENCE

www.j-evs.com



4. Publicaciones



ELSEVIER

FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., SÁNCHEZ, J.A., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: Analysis of the infection by endoparasites. **Veterinary Parasitology**, 164: 357-362.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: Analysis of the infection by endoparasites

I. Francisco^a, M. Arias^a, F.J. Cortiñas^a, R. Francisco^a, E. Mochales^a, J.A. Sánchez^a,
J. Uriarte^b, J.L. Suárez^a, P. Morrondo^a, R. Sánchez-Andrade^a, P. Díez-Baños^a, A. Paz-Silva^{a,*}

^aAnimal Pathology Department, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic diseases, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, Campus Universitario, s/n, 27002 Lugo, Spain

^bCentro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, CITA, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2008

Received in revised form 10 June 2009

Accepted 12 June 2009

Keywords:

Equine endoparasites

Silvopastoralism

Age

Sex

Autochthonous

PRG

ABSTRACT

Two groups of autochthonous Pura Raza Galega (PRG) horses, one comprising 483 animals under a silvopasturing regime, and the other comprising 72 PRG horses managed in farms, were used to analyse the effect of silvopasture on infection by endoparasites. Results were considered according to the age and the sex of the horses. Faecal samples were individually collected from each animal and analysed by the coprological flotation, sedimentation and migration techniques. Coprocultures were also done to identify the main strongylid genera affecting the horses.

Eggs from the gastrointestinal nematoda *Parascaris equorum*, strongyles and *Oxyuris equi* were the only endoparasites observed in the faeces of the horses. Larvae of *Trichonema* and *Cyalocephalus* spp. (small strongyles) and *Strongylus* and *Triodontophorus* (large strongyles) were identified in the coprocultures.

The silvopasturing horses had the highest prevalence of the helminth parasites. The percentage of horses passing ascarid eggs was significantly higher in pasturing horses younger than 3 years. The prevalence of strongyles was statistically greater in the oldest grazing equines. Mares reached the highest prevalence of helminth egg output. Our results showed that native horses kept under silvopasture had the highest prevalence of the ascarids, strongyles and oxyurids, possibly due to their exposure to contaminated grazing areas, lack of appropriate feeding and control of their health status. We conclude that silvopasture increases the presence of infection by gastrointestinal nematoda in wild horses, especially by strongyles. Suitable measures to control parasitic diseases affecting horses in silvopasture should be considered in those systems.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Silvopastoralism is an agroforestry management focused on the production of livestock and tree products in one integrated pasture system. These are inherently sustainable systems increasing biological diversity, protecting water quality, reducing soil erosion and improving

the water-holding capacity of the soil. Another important benefit is that livestock grazing is a biological weed control, thus decreasing the need for herbicides (Sharrow, 1999). Other benefits include natural insect control, opportunities for recreational activities like hunting and birdwatching and enhanced aesthetics and property values (McAdam, 2004).

In the past 5 years, this land-management strategy has become very important in areas where coniferous trees exist. Currently, these systems primarily involve cattle, goats or sheep. Other potential livestock choices include

* Corresponding author. Tel.: +34 982285900; fax: +34 982252195.
E-mail address: adolfo.paz@usc.es (A. Paz-Silva).

horses, turkeys, chicken and ostriches. The horses are raised to provide income through sales and subsidies (Husak and Grado, 2002). It remains very clear that livestock need to be inspected for parasites because of the effect on their health status. The valuable effect of horses grazing over the unwanted vegetation can be severely reduced when equines are parasitised.

The autochthonous breeds seem the most appropriate ones for grazing under a silvopastoral system due to their natural adaptation ability. Indigenous livestock breeds have been during the past decades at the centre of public interest as a part of total biodiversity preservation strategy. Furthermore, these are important breeds with regard to ensuring genetic variability, essential for food production in the future. However, wider public interest is directed towards re-activating old breeds in order to preserve tradition, traditional culinary, rural environment, pasture and other areas.

The silvopasturing animals have a greater possibility of infection caused by several parasites (Francisco et al., 2007), and infection caused by endoparasites such as helminths is one of the most important factors affecting horses worldwide (Hung et al., 1999; Pereira and Vianna, 2006).

This study aimed to analyse the endoparasitic infections affecting the digestive tracts of equines and their prevalence in NW Spain. For this purpose, faecal samples from 555 indigenous Pura Raza Galega (PRG) horses were taken and examined for the presence of endoparasites. Two groups of horses were used to obtain additional information on the influence of silvopasture on infection: one group comprising 483 animals under a silvopasturing regime and the other comprising 72 managed PRG horses. Results were also analysed according to age and sex of the horses.

2. Materials and methods

2.1. Area of study

From December 2007 to April 2008, a coprological survey was carried out in autochthonous PRG horses in NW Spain (42°20′–43°45′N, 6°49′–8°00′W). Collection of samples during this period guaranteed that the horses had been dewormed at least 6 weeks earlier.

The current study was conducted in several farms located at different sites interspersed within this area, and the distance among the farms is approximately 20–100 km.

2.2. Experimental design

Two groups of native horses were used: one comprising 483 animals under silvopasture belonging to 18 farms, with an average of 27 animals (range: 1–105 animals). Another group comprised 72 horses managed in 8 farms, with an average of 9 animals each (range: 1–35 animals), which are maintained outdoors and are only brought into the paddocks at night. These horses routinely graze on domestic pastures, and are supplemented with grain and roughage when necessary. Chemotherapy is only done once a year (in September).

The PRGs under silvopasture are mainly maintained outdoors where they graze freely on natural pastures characterised by annual grass species, and supplementation is never provided by their owners. These animals often received insufficient feeding and veterinary attention. They are used to reduce unwanted vegetation, and very few economic benefits can be achieved by meat production. Most mares foal between May and June. The number of PRGs under a management other than silvopasture is less because of its low economical value. Deworming is seldom applied.

Table 1 reflects the distribution of the faecal samples in relation to their age, sex and housing. All the animals in each group were managed in the similar fashion.

The average number of horses per hectare is approximately two in the silvopasturing group and one in the managed group.

The most common annual grass species in pastures are *Dactylis glomerata* and *Trifolium repens*. In silvopastures, they are *Agrostis capillaries*, *D. glomerata*, *Ulex galii*, *Erica mackaiana* and *Juncus effusus*.

It is noteworthy that, in these pastures, machines are used to plough, sow the annual grass species and enhance their growth and development. This agrarian labour implies that land is turned out. Nevertheless, the places under silvopasture are not often worked, mainly due to the difficulty in introducing machinery in these locations.

2.3. Coprological techniques

Individual faecal samples were collected directly from the rectum of the horses and analysed by using coprological methods. Five grams of each faecal sample were processed (in duplicate) by flotation, sedimentation and migratory techniques (MAFF, 1986), with a sensitivity of 10 eggs per gram of faeces. The counts of nematode eggs were provided as counts of eggs per gram (EPG).

The laboratory technician conducting the microscopic analysis was blinded to the study design of the selection of the stool specimens.

Because it is not possible to morphologically distinguish strongyle eggs of different species, faecal samples are cultured for 10–14 days at 20–25 °C to allow for the development of L3s, which may be collected by means of the Baermann procedure (Osterman et al., 1999; Kuzmina et al., 2006) and identified according to the methods by Lichtenfels (1975) and Lichtenfels et al. (1997).

2.4. Statistical analysis

The descriptive parameters for the shedding of eggs in the faeces were the EPG quartiles 1, 2 and 3. All tests were done using SPSS for Windows (14.1; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Considering that egg shedding is not normally distributed, statistical analysis was done by means of the non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* two-sided tests ($\alpha = 0.05$), and significant differences were considered when $p < 0.05$.

Prevalences were expressed as percentage and 95% confidence interval (CI) and analysed using the Chi-square (χ^2) test.

Table 1
Distribution of the faecal samples from horses according to their housing, gender and age.

Prevalence	Housing				EPG				
	Housing		Analysis		Statistics	Housing		Analysis	
	Farm	Silvopasture	χ^2	<i>p</i>		Farm	Silvopasture	Z	<i>p</i>
Total									
<i>P</i> (95% CI)	2 (0, 4)	15 (12, 18)	7.793	0.005	Q1	100	0	1.931	0.165
					Q2	100	0		
					Q3	100	50		
Age (year)									
<3	2 (0, 4)	26 (22, 30)	10.085	0.001	Q1	100	0	0.356	0.722
					Q2	100	67		
					Q3	100	225		
3–10	0	13 (10, 16)	2.606	0.106	Q1	0	0		
					Q2	0	0		
					Q3	0	0		
>10	0	7 (5, 9)	0.149	0.700	Q1	0	0		
					Q2	0	0		
					Q3	0	0		
χ^2	0.508	13.408			χ^2		21.507		
<i>p</i>	0.776	0.001			<i>p</i>		0.001		
Sex									
Female	0	16 (13, 19)	5.567	0.018	Q1	0	0		
					Q2	0	0		
					Q3	0	50		
Male	3 (0, 6)	7 (5, 9)	0.518	0.472	Q1	100	0	0.249	0.396
					Q2	100	0		
					Q3	100	125		
χ^2	1.017	2.923			χ^2		0.183		
<i>p</i>	0.313	0.087			<i>p</i>		0.669		

Correlation among the different parameters was assessed using the non-parametric Spearman's rank correlation test.

3. Results

3.1. Identification of parasites

Eggs from the gastrointestinal nematoda *Parascaris equorum*, strongyles and *Oxyuris equi* were observed in the faeces of the horses. No coccidian or eggs from trematoda, cestoda or lungworm larvae were observed.

We identified *Trichonema* and *Cyalocephalus* spp. (small strongyles) and *Strongylus* and *Triodontophorus* (large strongyles) by coprocultures. No differences in the genera of strongyles identified according to age, sex or housing were recorded.

3.2. Effect of housing

The highest prevalences of ascarids, strongyles and oxyurids were observed in silvopastured horses; however, significant differences were detected only for *P. equorum*

Table 2
Prevalence (expressed as percentage and 95% confidence interval) and egg-output values (expressed as quartiles) of *Parascaris equorum* in autochthonous Pura Raza Galega horses.

Prevalence	Housing				EPG				
	Housing		Analysis		Statistics	Housing		Analysis	
	Farm	Silvopasture	χ^2	<i>p</i>		Farm	Silvopasture	Z	<i>p</i>
Total									
<i>P</i> (95% CI)	1 (0, 3)	15 (12, 18)	7.793	0.005	Q1	100	0	1.931	0.165
					Q2	100	0		
					Q3	100	50		
Age (year)									
<3	2 (0, 6)	26 (19, 33)	10.085	0.001	Q1	100	0	0.356	0.722
					Q2	100	67		
					Q3	100	225		

Table 2 (Continued)

Prevalence	Housing				EPG				
	Housing		Analysis		Statistics	Housing		Analysis	
	Farm	Silvopasture	χ^2	p		Farm	Silvopasture	Z	p
3–10	0	13 (9, 17)	2.606	0.106	Q1 Q2 Q3	0 0 0	0 0 0		
>10	0	7 (2, 12)	0.149	0.700	Q1 Q2 Q3	0 0 0	0 0 0		
χ^2 p	0.508 0.776	13.408 0.001			χ^2 p		21.507 0.001		
Sex									
Female	0	16 (12, 19)	5.567	0.018	Q1 Q2 Q3	0 0 0	0 0 50		
Male	3 (0, 6)	7 (1, 13)	0.518	0.472	Q1 Q2 Q3	100 100 100	0 0 125	0.249	0.396
χ^2 p	1.017 0.313	2.923 0.087			χ^2 p		0.183 0.669		

and strongyles (Tables 2–4). Although the EPG for all three parasites were greater in the silvopastured horses, significant differences were detected only for strongyles (Table 3).

3.3. Influence of age

The percentage of horses shedding *Parascaris* eggs and the EPG was significantly greater in the youngest animals

Table 3

Prevalence (expressed as percentage and 95% confidence interval) and egg-output values (expressed as quartiles) of strongyles in autochthonous Pura Raza Galega horses.

Prevalence	Housing				EPG				
	Housing		Analysis		Statistics	Housing		Analysis	
	Farm	Silvopasture	χ^2	p		Farm	Silvopasture	Z	p
Total P (95% CI)	42 (31, 53)	86 (83, 89)	63.044	0.001	Q1 Q2 Q3	0 0 150	100 300 700	46.375	0.001
Age (year)									
<3	32 (19, 45)	74 (67, 81)	19.766	0.001	Q1 Q2 Q3	0 0 50	0 150 350	4.598	0.001
3–10	61 (39, 83)	88 (84, 91)	10.884	0.001	Q1 Q2 Q3	0 100 287	100 350 750	2.813	0.005
>10	67 (13, 100)	90 (84, 96)	3.274	0.070	Q1 Q2 Q3	0 1000 2000	104 275 700	0.033	0.973
χ^2 p	4.240 0.120	15.561 0.001			χ^2 p	5.821 0.054	12.658 0.002		
Sex									
Female	50 (34, 65)	86 (83, 89)	28.241	0.001	Q1 Q2 Q3	0 25 250	100 300 700	4.172	0.001
Male	33 (17, 49)	77 (67, 87)	15.597	0.001	Q1 Q2 Q3	0 0 100	35 150 587	4.063	0.001
χ^2 p	1.714 0.190	12.837 0.001			χ^2 p	2.237 0.135	4.079 0.043		

Table 4
Prevalence (expressed as percentage and 95% confidence interval) and egg-output values (expressed as quartiles) of *Oxyuris equi* in autochthonous Pura Raza Galega horses.

Prevalence	Housing		Analysis		EPG					
	Farm	Silvopasture	χ^2	p	Housing		Analysis		Z	p
					Farm	Silvopasture	Z	p		
Total					Q1	50	50		0.349	0.555
P (95% CI)	1 (0, 4)	5 (3, 7)	1.435	0.231	Q2	50	100			
					Q3	50	187			
Age					Q1	50	50		0.5	0.617
<3	2 (0, 6)	4 (1, 7)	0.295	0.587	Q2	50	50			
					Q3	50	275			
3–10	0	4 (2, 6)	0.767	0.381	Q1	0	33			
					Q2	0	75			
					Q3	0	212			
>10	0	10 (4, 16)	0.215	0.643	Q1	0	83			
					Q2	0	100			
					Q3	0	212			
χ^2	0.508	3.687			χ^2		0.639			
p	0.770	0.158			p		0.727			
Sex					Q1	50	46		0.651	0.515
Female	3 (0, 8)	5 (3, 7)	0.246	0.620	Q2	50	100			
					Q3	50	212			
Male	0	4 (0, 9)	1.097	0.295	Q1	0	50			
					Q2	0	50			
					Q3	0	50			
χ^2	1.017	0.344			χ^2		0.808			
p	0.313	0.557			p		0.369			

($\chi^2 = 6.600$, $p = 0.037$ and $\chi^2 = 22.855$, $p = 0.001$, respectively). The infection by ascarids reduced with the age (Table 2), and a negative and significant correlation between the age and the number of *Parascaris* eggs was matched ($r = -0.417$, $p = 0.001$).

The prevalences and the egg output for strongyles and oxyurids increased with the age, with the greatest values in the horses older than 3 years (Tables 2–4). A positive correlation between the age and the strongyle egg output was achieved ($r = 0.317$, $p = 0.034$).

The combined analysis of the influence of age and housing showed the highest prevalence and excretion of ascarid eggs in the youngest animals under silvopasture. The greatest percentages of strongyles and oxyurids were observed in the oldest horses of G-S. Nevertheless, EPG for strongyles were recorded in that from G-F, and for oxyurids in those from G-S.

3.4. Effect of sex

The prevalences of ascarids, strongyles and oxyurids were greater in females than in males (Tables 2–4), obtaining significant differences for the ascarids ($\chi^2 = 4.780$, $p = 0.029$) and the strongyles ($\chi^2 = 19.411$, $p = 0.001$).

Males recorded the highest EPG values for *Parascaris*, and mares for strongyles ($\chi^2 = 19.720$, $p = 0.001$) and oxyurids.

By considering sex and housing of the horses together, we observed that the silvopasturing mares reached the greatest values of prevalence and egg output for strongyles and pinworms (Tables 2–4). Females in the G-S achieved the highest percentages of shedding *Parascaris* eggs, but the EPG was superior in the males of the same group.

4. Discussion

Well-managed grazing in pasture-forests provides economical control of weeds and brush without herbicides and maintains fire breakouts. Grazing can control grass competition for moisture, nutrients and sunlight, thereby enhancing tree growth. In addition, livestock manure recycles nutrients to trees and forage (Klopfenstein et al., 1997; Loehle, 2004).

To ascertain the effect of silvopasture on the parasitic burden, two groups of native horses were considered: one managed in farms and the other under a pasturing regime. The prevalence of nematodes in the silvopasturing flock was two- to threefold greater than that recorded in the farming horses. The females grazing in pasture-forests had significant highest prevalence of ascarids and strongyles.

It has been shown that helminth infection is ubiquitous in horses with access to pasture (Bucknell et al., 1995; O'Meara and Mulcahy, 2002; Romaniuk et al., 2004; Pereira and Vianna, 2006). Our results could be explained by the

differences in the managing conditions of the animals. The managed PRGs routinely graze on domestic pastures, where some land practices contribute to prevent or reduce the viability of the parasitic forms (e.g., eggs and larvae). These are horses that are adequately fed, and their proximity enhances sampling and application of anti-parasitic chemotherapy when necessary.

The wild horses under extensive regime are difficult to sample and to administer any parasiticide. Feeding depends on climatic conditions that favour grass growth. There is no land management that destroys the habitat of parasitic resistance forms. Therefore, helminth eggs that pass out of these horses hatch and release larvae into the environment, thus increasing pasture contamination.

Silvopasture offers a diversified marketing opportunity that can stimulate rural economic development. In this system, the interactions among timber, forage and livestock must be managed to simultaneously produce timber commodities, a high-quality forage resource and an efficient livestock production (Bradshaw et al., 2003). In the current investigation, a significantly higher prevalence of ascarids and strongyles in the grazing young horses than in farming ones was proved. It has been shown that *Parascaris* infections may cause respiratory symptoms and bad appetite, along with weakness, decreased growth, enteritis and occasionally obstruction and peritonitis (Boyle and Houston, 2006). This could lead to a reduction in the short-term cash flow provided by the foals. It must be noted that foals can be infected when milking from parasitised mares and that females under silvopasture exhibited the highest percentages of infection by ascarids in the present study.

Our results showed that autochthonous horses kept under this regime have increased the prevalence of some helminths (e.g., ascarids, strongyles and oxyurids), possibly due to their exposure to contaminated grazing areas, lack of appropriate feeding and control of their health status.

We conclude that silvopasture increases infection by gastrointestinal helminth parasites in wild horses. Suitable measures to control the parasitic diseases affecting horses in silvopasture should be considered in those systems.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by a research grant from the Xunta de Galicia (XUGA, Spain) to I. Francisco and R. Francisco, and by the Projects XUGA PGID-T06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain), and complies with the current laws for Animal Health Research in Spain. We are indebted to Mrs. B.

Valcárcel for preparing and editing the manuscript. We owe our thanks to PURAGA (Muras, Spain), APRCG (Boqueixón, Spain) and Grupoportichol (Muras, Spain) for helping us to collect the samples.

References

- Bradshaw, R.H.W., Hannon, G.E., Lister, A.M., 2003. A long-term perspective on ungulate–vegetation interactions. *Forest Ecol. Manage.* 181, 267–280.
- Boyle, A.G., Houston, R., 2006. Parasitic pneumonitis and treatment in horses. *Clin. Technol. Equine Pract.* 5, 225–232.
- Bucknell, D.G., Gasser, R.B., Beveridge, I., 1995. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria. *Aust. Int. J. Parasitol.* 25, 711–724.
- Francisco, I., Arias, M.S., Sánchez-Andrade, R., Paineira, A., Diaz, P., Morondo, P., Diez-Bañós, P., Paz-Silva, A., 2007. Preliminary detection of infection by gastrointestinal nematoda in horses from NW Spain. In: 21st International Conference of the WAAVP, Gent (Belgium), 19–23 August.
- Hung, G.C., Gasser, R.B., Beveridge, I., Chilton, N.B., 1999. Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. *Parasitology* 119, 69–80.
- Husak, A.L., Grado, S.C., 2002. Monetary benefits in a southern silvopastoral system. *South. J. Appl. Forestry* 26, 159–164.
- Klopfenstein, N., Rietveld, W., Carman, R., Clason, T., Sharrow, S., Garrett, G., Anderson, B., 1997. Silvopasture: an agroforestry practice. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. *Agroforestry* 8 (Notes-8).
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Kharchenko, V.A., 2006. Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Vet. Parasitol.* 141, 264–272.
- Loehle, C., 2004. Applying landscape principles to fire hazard reduction. *Forest Ecol. Manage.* 198, 261–267.
- Lichtenfels, J.R., 1975. Helminths of domestic equids. Illustrated keys to genera and species with emphasis on North American forms. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 42, 1–92.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Sommer, C., Ito, M., 1997. Key characters for the microscopic identification of *Cylicocycylus nassatus* and *Cylicocycylus ashworthi* (Nematoda: Cyathostominae) of the horse, *Equus caballus*. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 64, 120–127.
- MAFF, 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, HMSO, London (UK).
- McAdam, J.H., 2004. Silvopastoral systems in North-West Europe. In: Mosquera-Losada, M.R., McAdam, J., Rigueiro-Rodríguez, A. (Eds.), *Silvopastoralism and Sustainable Land Management*. CAB Internacional, p. 429 pp.
- O'Meara, B., Mulcahy, G., 2002. A survey of helminth control practices in equine establishments in Ireland. *Vet. Parasitol.* 109, 101–110.
- Osterman, E., Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Uggla, A., 1999. A field survey on the distribution of strongyle infections of horses in Sweden and factors affecting faecal egg counts. *Equine Vet. J.* 31, 68–72.
- Pereira, J.R., Vianna, S.S., 2006. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 140, 289–295.
- Romaniuk, K., Reszka, K., Lasota, E., 2004. Influence of animal breeding manner on the occurrence of internal parasites. *Wiad. Parazytol.* 50, 647–651.
- Sharrow, S.H., 1999. Silvopastoralism: competition and facilitation between trees, livestock and improved grass-clover pastures on temperate rainfed lands. In: Buck, L.E., Lassoie, J.P., Fernandes, E.C.M. (Eds.), *Agroforestry in Sustainable Agricultural Systems*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 416 pp.

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P. SCALA, A., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2010). Chronobiology of *Gasterophilus* infestations in silvopasturing horses from NW Spain. **Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología**, 69: 66-71.

Artículo de Original

Chronobiology of *Gasterophilus* infestations in silvopasturing horses from NW Spain

CORTIÑAS F. J., FRANCISCO I., SÁNCHEZ J., MULA P.¹, CAZAPAL C., SUÁREZ J. L., VÁZQUEZ L., FRANCISCO R., ARIAS M. S., DÍEZ-BAÑOS P., SCALA A.², MORRONDO P., PAZ-SILVA A. and SÁNCHEZ-ANDRADE R.

¹ Epidemiology, Parasitology and Zoonoses, Animal Pathology Dept., College of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

² Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari (Sardinia, Italy).

ABSTRACT

The humoral immune response in horses from NW Spain was evaluated to establish the chronobiology of gasterophilosis. From January 2007 to January 2008 one herd of 13 horses was monthly bled and sera analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Gasterophilus intestinalis* second-stage larvae excretory/secretory antigens. Another group of 12 foals born in April 2007 was also sampled until slaughtered in October. Climatic data were collected from automatic weather stations to establish the pattern in the area of study. The examination of *Gasterophilus* eggs on the hair of the equines and 3rd instars passed by faeces were also monthly done. The kinetics of IgG response decreased from January to July, a slow increment was noted from August to November, and then antibodies increased again to January. Third-instar larvae were observed in the faeces in March-May, and *Gasterophilus*-eggs from June to September. It is concluded that in oceanic climate areas, the egg-laying period occurs from late spring. First-instar larvae are in the mouth in early summer. During summer second-instar larvae move into the stomach and intestine, where third-instar larvae remain until the end of winter, then pupation takes place and the adult horse bot flies emerge in the spring.

Key words: Silvopasturing horses, *Gasterophilus intestinalis*, oceanic climate, IgG, excretory/secretory antigens, chronobiology.

RESUMEN

En caballos del NO de España se evaluó la respuesta inmune humoral con objeto de establecer la cronobiología de la gasterofilosis. Desde enero de 2007 a enero de 2008, en un grupo de 13 caballos, se tomaron muestras mensuales de sangre, y los sueros se analizaron mediante un inmunoensayo (ELISA) con antígenos de secreción/excreción de larvas de segundo estadio de *G. intestinalis*. También se investigó otro

Received: 27 October 2009. Accepted: 10 December 2009.

Corresponding: Sánchez-Andrade R.
Tel.: 34982285900; fax: 34982252195
E-mail address: rita.sanchez-andrade@usc.es.

grupo de 12 potros, desde su nacimiento (en abril de 2007) hasta su sacrificio, en octubre del mismo año. Los datos climáticos, que sirvieron de base para establecer el modelo, se tomaron en estaciones meteorológicas de las zonas de estudio. Mensualmente se determinaba la presencia de huevos de *Gasterophilus* en el pelo de los équidos, así como las larvas de tercer estadio eliminadas con las heces. La curva de la respuesta de IgG decreció desde enero a julio, observándose un lento incremento entre agosto y noviembre; posteriormente, el nivel de anticuerpos de nuevo ascendió hasta enero. En las heces se observaron larvas de tercer estadio de *Gasterophilus* entre marzo y mayo, mientras que, entre junio y septiembre, se encontraron huevos en el pelo. De estos resultados se concluye que, en áreas con clima oceánico, la puesta de huevos por los adultos de *Gasterophilus* se inicia al final de la primavera. Las larvas de primer estadio se encuentran en la mucosa bucal al inicio del verano y, durante los meses siguientes del verano, las larvas de segundo estadio alcanzan el estómago e intestino, donde pasan a larvas de tercer estadio que permanecen hasta el final del invierno; posteriormente, durante la primavera, tiene lugar la pupación y liberación de las moscas adultas.

Palabras clave: Caballos silvopastoreo, *Gasterophilus intestinalis*, clima oceánico, IgG, antígenos de excreción/secreción, cronobiología.

INTRODUCTION

Gasterophilosis is a myiasis affecting equid hosts caused by *Gasterophilus* spp. larvae (Diptera: Oestridae) mainly in the Palaearctic and Afrotropical regions (Colwell *et al.*, 2006). Adult bot flies deposit their eggs on the host's hair except *G. pecorum*, as females leave them on the grass (Cogley & Cogley, 2000). When the eggs are introduced into the mouth, the first-instar larvae hatch and moult to L2, which can be present in different regions of the gastrointestinal tract where the L3 remains attached to the mucosa for 8-10 months (Zumpt, 1965).

The clinical signs showed by horses infested by *Gasterophilus* may include swallowing, gastrointestinal ulcerations, gut obstructions or volvulus, rectal prolapses, anaemia, diarrhoea or digestive disorders (Gokçen *et al.*, 2008). Although only few, there are reports of human myiasis associated with *Gasterophilus* larvae, causing subcutaneous tiptoeing or ophthalmomyiasis (Royce *et al.*, 1999; Chen, 2001; Anderson, 2006). Infections by *Gasterophilus* larvae have also been described in dogs (Taylor *et al.*, 2002).

Gasterophilosis is a myiasis with a wide geographical distribution, as shown by investigations in different countries as Belgium, Turkey, Ireland, France, Germany or Sweden (Colebrook & Wall, 2004; Gokçen *et al.*, 2008), but the highest prevalences were found in warm areas from Italy, Mexico or Brazil (Escartín-Peña & Bautista-Garfias, 1993; Otranto *et al.*, 2005; Rodrigues-Félix *et al.*, 2007).

In previous investigations *G. intestinalis* and *G. nasalis* have been the species most frequently reported (Lyons *et al.*, 1994; Sequeira *et al.*, 2001), and the occurrence of infestations by different species of *Gasterophilus* have also been usually mentioned.

The presence of this myiasis is commonly detected at the slaughter of the horses, or even when L3 instars are observed in the rectum or they are passed by faeces (Gökçen *et al.*, 2008). Another possibility consists of the examination of eggs laid on the hair of the horses (Dawson, 2003). Few studies on the suitability of immunoenzymatic probes for the diagnosis of gasterophilosis have been developed (Escartín-Peña & Basutista-Garfias, 1993; Boulard *et al.*, 1996).

It is noteworthy the difficulty to associate the migration and maturation of stages of the larvae with the clinical signs (Cogley & Cogley, 1999). The absence of information on the humoral immunological response to *Gasterophilus* complicates the development of serological studies, although the characterization of L2 and L3 proteins of *G. intestinalis* have been recently reported (Roelfstra *et al.*, 2009).

In the current study, the presence of IgG antibodies against L2 excretory/secretory antigens in horses from NW Spain was analyzed. The climatic pattern was established by collecting different parameters from automated meteorological stations in the study area. The results were discussed together with data from the examination of *Gasterophilus*

F. J. CORTIÑAS et al.

eggs on the hair of the equines, and 3rd instars passed by faeces.

MATERIALS AND METHODS

Variations on climatic parameters: The current investigation was conducted in Lugo (NW Spain, 42°20'–43°45'N, 6°49'–8°00'W). To establish the climatic pattern in the area where the study was conducted, the values of maximum temperature, minimum temperature, rainfall, and relative humidity were obtained monthly from 32 automatic weather stations.

Horses: Between January 2007 and January 2008, blood samples from two groups of silvopasturing equines in NW Spain were collected. Group 1 was formed by 13 adult horses belonging to the autochthonous Pura Raza Galega (PRG). Group 2 was constituted by 12 PRG foals born in April. These equines were only sampled from April to September, because they were slaughtered in October.

All the animals in each group had the same management conditions. The autochthonous PRGs under silvopasture are grazing on forest areas with natural pastures characterized by annual grass species, and food supplementation is never provided by their owners (Francisco *et al.*, 2009). No veterinary attention is provided. The main benefit afforded is reduction of uncontrolled vegetation, and very few economical benefits can be achieved by meat-production. Most mares foal between April–June.

Direct detection of infestation: The examination of the equines' hair was monthly done for the visual appraisal of bot eggs attached on the lower legs, lips or jaw. Faeces were also macroscopically examined for the presence of 3rd instars.

Indirect diagnosis of gasterophilosis: The humoral immune response of equines against *Gasterophilus* was analyzed by an ELISA and *G. intestinalis* excretory/secretory antigens.

a) *G. intestinalis* excretory/secretory antigen preparation: The use of excretory/secretory antigens was based on prior reports of successful use

of these antigens regarding their immunogenicity (Sánchez-Andrade *et al.*, 2005; Roelfstra *et al.*, 2009).

Briefly, L2 larvae obtained from naturally infected horses at a local slaughterhouse were washed in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2). In the lab, the 2nd instars were incubated in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) culture medium at 37°C and 5% CO₂ atmosphere for 3 days, with changes every 8–10 hours. Then the medium was collected, dialyzed exhaustively against water, and lyophilized. The protein concentration was estimated by using the BCA® kit (Pierce, Mo, USA).

b) ELISA protocol: ELISAs using excretory/secretory products from L2 *G. intestinalis* were performed on serum samples (Suárez *et al.*, 2005). The antigen was diluted in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to a concentration of 2.5 mg mL⁻¹ to coat the wells of the ELISA plates (Costar, Corning Inc.). Serum samples were diluted 1:250 in PBS containing 0.05% Tween and 1% skim milk, and horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) goat anti-horse IgG (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) was used at 1:2500 dilutions. Absorbances were read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan, Hämmeleina) at 492 nm.

Pooled sera from 15 uninfested and 27 infested horses were used as negative and positive controls, respectively. Positive control sera belonged to horses with many *G. intestinalis* larvae when slaughtered. Negative control sera were obtained from yearlings, which had been kept housed since birth to avoid many *G. intestinalis* infestation.

Statistical analysis: Statistical analysis was conducted using analysis of variance (ANOVA), and differences were considered significant when $P < 0.05$. The Pearson's correlation test was applied to evaluate the existence of correlation among the different variables considered. All tests were performed by the statistical package SPSS, version 15 (SPSS Inc.).

RESULTS & DISCUSSION

Climatic pattern: The annual average values of maximum and minimum temperature and rainfall

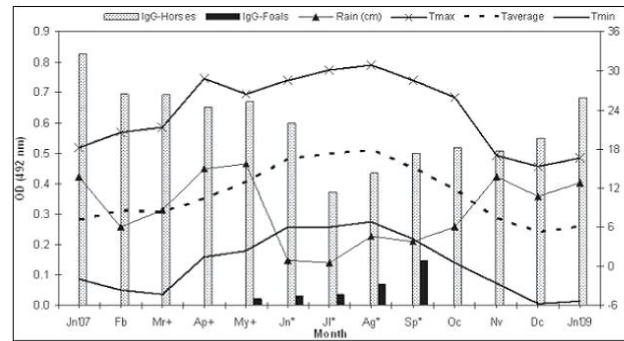


Figure 1. Climatic pattern in the area of study (NW Spain) and IgG kinetics in silvopasturing horses against L2 *Gasterophilus intestinalis* excretory/secretory antigens. Bars represent mean IgG values. (+): presence of L3 *Gasterophilus* larvae in the faeces; (*): observation of *Gasterophilus*-eggs on the horses' hairs.

are represented in Figure 1. The values of rainfall ranged from 0.6 (July) to 16 cm (May).

An average value of temperature from 18°C in August to 5.3°C in December was observed. The minimum and maximum temperatures exhibited the same pattern. This is typical of an oceanic climate area, and is usually found along the west coasts at the middle latitudes (40°-60°N) of all the world continents and in southeastern Australia; similar climates are also found at coastal tropical highlands and tropical coasts on the leeward sides of mountain ranges (Kottek *et al.*, 2006).

Direct diagnosis: *Gasterophilus intestinalis* third-instar larvae were observed in the faeces of G-1 in March-May, and *Gasterophilus*-eggs from June to September (Figure 1). Sievers & Weber (2005) indicated that the egg laying period occurred when the mean temperatures were over 15°C, and

that it is negatively influenced by rainfall. In the current investigation, these conditions were present from June to August.

Kinetics of the humoral IgG immune response: The variations in the IgG kinetics in the equines are represented in Figure 1. The IgG antibodies decreased from January to July, when the lowest values were reached. A slow increment was noted from August, and a plateau level until November was noted in the horses of G-1. The antibodies increased again in January. The IgG response in the foals was detected in September. Significant differences regarding the month were observed in G-1 ($F = 13.459$, $P = 0.001$).

Relationship among the IgG humoral immune response, the presence of L3 *Gasterophilus* in faeces and eggs attached to the horse's hairs: The existence of 3rd instar larvae of *Gasterophilus* in the faeces was matched in March-May, whereas *Gasterophilus*-eggs were observed from June to September (Figure 2). Both *G. intestinalis* and *G. nasalis* 3rd stages were identified and classified according to Zumpt (1965).

After the 3rd instars being matured, they leave the gastrointestinal tract and are voided in the faeces, and then pupate into the soil or dried manure (Cogley & Cogley 2000). Pupation is temperature-dependent, taking 22-28 days at 22-25°C and 32 days at 18°C (Edwards, 1982). By considering that adult activity needs for temperatures in excess of 15°C to fly (Sievers & Weber, 2005), and that rainfall has a negative influence, it seems very reasonable to assume that under the climatic

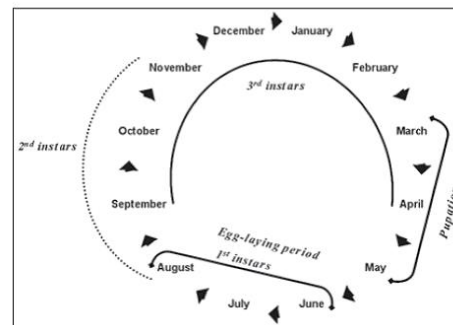


Figure 2. Chronobiology of *Gasterophilus intestinalis* in NW Spain.

conditions reflected in Figure 2, pupation ends on June and adults fly from June to August. The finding of *Gasterophilus*-eggs on the horses' hair between June and September (Figure 1) supports this hypothesis, corroborated by the finding of L3 larvae 8 months later (since March) (Zumpt, 1965). The observation of the lowest IgG values in July reflects that the antigenic stimulus reduced or ended at that period, which is in coincidence with the presence of *Gasterophilus*-eggs fixed to the hairs. It has been described that eggs hatch and the larvae either crawl to the mouth or are ingested and remain in the mouth for approximately 1 month (DuPonte & Larish, 2003).

The first instars molt to 2nd instars and move into the stomach, where they become into third-instar larvae and remain immobile for the following 8-10 months. Roelfstra *et al.*, (2009) reported that the larval stage L2 possesses more antigenic proteins and induces a stronger immune response in the host than the larval stage L3, probably helpful for larval migration. In the present work, a significant increment in the antibody response was noted from August to reach a plateau level until November. This hypothesis might be supported by the observation of IgG antibodies in September in the foals born in April.

Nevertheless, although L3 stay attached for 8-10 months to the stomach wall, and an hypometabolic status with reduced immunogenic properties has been suggested (Roelfstra *et al.*, 2009), it appears very conceivable that the rising in the IgG response in January herein could be related to the presence of hooked mouthparts and spines in the *Gasterophilus* larvae, responsible for the occurrence of hemorrhages, chronic gastritis, ulcerated stomach or even stomach rupture, which enhance the antigen presentation to the immune system in the horse.

Our results lead us to define the chronobiology of *G. intestinalis* in horses from NW Spain (Figure 2). The cycle begins with the egg-laying period (late spring and summer). The eggs are introduced into the horse mouth, and the L1 burrow into the tongue, and feed there for about 1 month (summer). After wandering in the mucosa of the mouth, these larvae molt to 2nd instars and move into the stomach and intestine (summer-autumn). The second and later third stage larvae attach to the lining of the stomach in the non-glandular portion near the junction of the

esophageal and cardiac regions (summer-winter). After the third instars have matured, they detach from the gastrointestinal tract and exit in the feces, where they pupate (spring). The adult horse bot fly emerges after a 1-3 month period (summer).

REFERENCES

- ANDERSON JR. (2006). Oestrid myiasis of humans. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ (Eds.), *The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management*. CAB International.
- BOULARD C, VILLEJOURBERT C, MOIRÉ N. (1996). Cross-reactive, stage-specific antigens in the Oestridae family. *Vet Res* 27: 535-544.
- CHEN XN. (2001). A case of skin myiasis caused by *Gasterophilus nigricornis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 19: 60.
- COGLEY TP, COGLEY MC. (1999). Inter-relationship between *Gasterophilus* larvae and the horse's gastric and duodenal wall with special reference to penetration. *Vet Parasitol* 86: 127-142.
- COGLEY TP, COGLEY MC. (2000). Field observations of the host-parasite relationship associated with the common horse bot fly, *Gasterophilus intestinalis*. *Vet Parasitol* 88: 93-105.
- COLEBROOK E, WALL R. (2004). Ectoparasites of livestock in Europe and the Mediterranean region. *Vet Parasitol* 120: 251-274.
- COLWELL DD, HALL MJR, SCHOLL PJ. (2006). A synopsis of the biology, hosts, distribution, disease significance and management of the genera. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ (Eds.), *The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management*. CAB International.
- DAWSON K. (2003). A non-lethal method for assessment of efficacy of antiparasitics against parasites in horses such as *Anoplocephala perfoliata* and *Gasterophilus intestinalis*. *Vet Parasitol* 115: 67-70.
- DUPONTE MW, LARISH LB. (2003). Horse bot fly, horse throat bot fly. College of Tropical Agriculture and Human Resources Publications. September.
- ESCARTÍN-PEÑA M, BAUTISTA-GARFIAS CR. (1993). Comparison of five tests for the serologic diagnosis of myiasis by *Gasterophilus* spp. larvae (Diptera: Gasterophilidae) in horses and donkeys: a preliminary study. *Med Vet Entomol* 7: 233-237.
- FRANCISCO I, ARIAS M, CORTIÑAS FJ, FRANCISCO R, MOCHALES E, SÁNCHEZ JA, SUÁREZ JL, MORRONGO P, URIARTE J, SÁNCHEZ-ANDRADE R, DíEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. *Vet Parasitol* 164: 357-362.
- GÖKÇEN A, SEVGİLİM, ALTAŞ MG, CAMKERTEN I. (2008). Presence of *Gasterophilus* species in Arabian horses in Sanliurfa region. *Turkiye Parazitol Derg* 32: 337-339.
- HÖGLUND J, LJUNGSTRÖM BL, NILSSON O.

- LUNDQUIST H, OSTERMAN E, UGGLA A. (1997). Occurrence of *Gasterophilus intestinalis* and some parasitic nematodes of horses in Sweden. Acta Vet Scand 38: 157-165.
14. KOTTEK M, GRIESER J, BECK C, RUDOLF B, RUBEL F. (2006). World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. Meteorol Z 15: 259-263.
 15. LYONS ET, TOLLIVER SC, STAMPER S, DRUDGE JH, GRANSTROM DE, COLLINS SS. (1994). Transmission of some species of internal parasites in horses born in 1990 and 1992 in the same pasture on a farm in central Kentucky. Vet Parasitol 52: 257-269.
 16. OTRANTO D, MILILLO P, CAPELLI G, COLWELL DD. (2005). Species composition of *Gasterophilus* spp. (Diptera, Oestridae) causing equine gastric myiasis in southern Italy: parasite biodiversity and risks for extinction. Vet Parasitol 133: 111-118.
 17. RODRIGUES S, SILVA CE, SCHMIDTT E, QUINTANA L, MENDES M, SILVA S. (2007). Presence of *Gasterophilus* (Leach, 1817) (Diptera: Oestridae) in horses in Rio Grande do Sul State, Brazil. Parasitol Latinoam 62: 122-126.
 18. ROELFSTRA L, DEEG CA, HAUCK SM, BUSE C, MEMBREZ M, BETSCHART B, PFISTER K. (2009). Protein expression profile of *Gasterophilus intestinalis* larvae causing horse gastric myiasis and characterization of horse immune reaction. Parasit Vectors 2: 6.
 19. ROMMEL M, ECKERT J, KUTZER E, KÖRTING W, SCHNIEDER T. (2000). Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Aufl., Parey, Berlin, Germany.
 20. ROYCE LA, ROSSIGNOL PA, KUBITZ ML, BURTON FR. (1999). Recovery of a second instar *Gasterophilus* larva in a human infant: a case report. Am J Trop Med Hyg. 60: 403-404.
 21. SÁNCHEZ-ANDRADE R, ROMERO JA, SUÁREZ JL, PEDREIRA J, DÍAZ P, ARIAS M, PAZ-SILVA A, PANADERO R, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, SCALA A. (2005). Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. Immunol Invest 34: 91-99.
 22. SEQUEIRA JL, TOSTES RA, OLIVEIRA-SEQUEIRA TC. (2001). Prevalence and macro- and microscopic lesions produced by *Gasterophilus nasalis* (Diptera: Oestridae) in the Botucatu Region, SP, Brazil. Vet Parasitol 102: 261-266.
 23. SIEVERS G, WEBER B. (2005). Periodo de oviposición de *Gasterophilus nasalis* y *G. intestinalis* en equinos: VIII Región, Chile. Arch Med Vet 37: 169-172.
 24. SUÁREZ JL, SCALA A, ROMERO JA, PAZ-SILVA A, PEDREIRA J, ARIAS M, DÍAZ P, MORRONDO P, DÍEZ-BAÑOS P, SÁNCHEZ-ANDRADE R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. Vet Parasitol 134: 153-158.
 25. WILLIAMS RE, KNAPP FW. 1999. Flies and external parasites of horses. Horse Industry Handbook 415.5-415.6.
 26. ZUMPT F. (1965). Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London, UK. pp. 111-128.
- Acknowledgements:** This work was supported, in part, by the Projects XUGA PGIDT06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain), and Research Fundings ex 60% 2008 (Università degli studi di Sassari), and complies with the current laws for Animal Health Research in Spain. We are in debt to Mrs. B. Valcárcel for preparing and editing the manuscript. Thanks to PURAGA (Muras, Spain), APRCG (Boqueixón, Spain), Granxa do Souto (Ortigueira, Spain) and Grupoportichol (Muras, Spain) for helping us to collect the samples.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., MORRONDO, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2011). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. **Journal of Equine Veterinary Science**, 31: 530-535.



Original Research

Efficacy of Ivermectin Pour-on Against Nematodes Infecting Foals on Pasture: Coprological and Biochemical Analysis

Ivan Francisco DVM, PhD, Jesús Antonio Sánchez DVM, Francisco Javier Cortiñas DVM, Rubén Francisco DVM, José Suárez DVM, Cristiana Cazapal DVM, José Luis Suárez DVM, PhD, María Sol Arias DVM, PhD, Patrocinio Morrondo DVM, PhD, DipEVPC, Rita Sánchez-Andrade PhD, Adolfo Paz-Silva DVM, PhD, DipEVPC

Department of Animal Pathology, Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses), University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 05 November 2010

Received in revised form

09 December 2010

Accepted 11 January 2011

Available online 21 March 2011

Keywords:

Horses

Deworming

Macrocyclic lactones

Pour-on

Silvopasturing

ABSTRACT

The efficacy of topical ivermectin (IVM) on foals naturally infected by parasitic nematodes was evaluated. Two dosages of IVM were applied pour-on (F-Nor0.5; 0.5 mg/kg body weight [BW] and F-Nor1; 1 mg/kg BW) and results compared with the oral administration (F-Eq0.2; 0.2 mg/kg BW of IVM). The efficacy was measured by estimating the reduction in the fecal egg counts (fecal egg count reduction) and in the numbers of horses shedding parasite eggs (positive horse reduction). Several biochemical and enzymatic serum parameters were measured in the groups F-Eq0.2 and F-Nor1. Before the deworming of the horses, eggs of *Parascaris equorum*, *Cyathostomum*, *Gyalocephalus* spp, and *Oxyuris equi* were identified. In all the treated groups, the excretion of ascarid eggs ended 4 days after the treatment. The orally administered IVM suppressed the egg output of strongyles and pinworms 4 days after the treatment, whereas for the F-Nor1 group this occurred 8 days after the treatment. Eggs of strongyles were detected in the F-Nor0.5 group throughout the study. The levels of blood urea nitrogen, creatinine, total proteins, albumin, globulins, and lactate dehydrogenase (LDH) reduced significantly after the administration of IVM, but values not within the normal range were only achieved for LDH. A significant positive correlation between the fecal egg output of cyathostomins and the LDH was investigated. Clinically, no adverse reactions in the horses receiving the topical IVM were observed. It was concluded that the pour-on administration of 1 mg/kg BW IVM provides similar results to the oral administration, and offers a very useful tool to control infestation by the intestinal nematodes affecting wild grazing horses.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

All the authors declare the absence of any financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) the current work. The final article has been approved by all the authors.

The current investigation complies with the current laws for Animal Health Research in Spain and with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments.

Corresponding author at: Adolfo Paz-Silva, DVM, PhD, DipEVPC, Department of Animal Pathology, University of Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002 Lugo, Lugo, Spain.

E-mail address: adolfo.paz@usc.es (A. Paz-Silva).

1. Introduction

Grazing or silvopasturing (combining forestry and grazing of domesticated animals in a mutually beneficial way) horses have a high probability of ingesting herbage infected with different parasites (trematoda, nematoda, cestoda), which enhances the simultaneous infection with various endoparasites [1,2].

It is well known that most strategies for parasite control rely on the use of anthelmintic drugs [3], but individual administration to wild grazing equids is problematic in practice because of the difficulty in ensuring their correct

immobilization to receive the right dosage. By considering that the topical administration decreases the risk of injury for both user and animal [4], it seems particularly convenient for the control of parasites affecting indigenous animals [5]. However, currently available pour-on preparations have been licensed only for use in cattle, sheep, and pigs.

Ivermectin (IVM) is the most used macrocyclic lactone (ML) for the deworming of livestock. In horses receiving an oral (paste or liquid) dose of 0.2 mg/kg body weight (BW) of IVM, a high efficacy (95%-100%) against adult and most fourth-stage larvae of cyathostomes, large strongyles, ascarids, or pinworms has been demonstrated [6]. Some investigations verified the absence of strongyle eggs for about 8 weeks after treatment for horses that were administered IVM [7,8], although a decrease in the strongyle egg reappearance periods has been also pointed out and related to the anthelmintic resistance [9,10].

There are a scarce number of investigations regarding the pour-on administration of anthelmintics in horses. Although an 82% to 97% reduction in the counts of eggs per gram of feces was obtained after the topical administration of 0.5 mg/kg BW of IVM [11], a 100% efficacy was recorded by increasing the dose to 1 mg/kg BW in silvopasturing horses [5]. The main goal in the current investigation was to assess the efficacy of two doses of IVM administered pour-on. The changes in several biochemical and enzymatic serum indicators were also analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Horses

Naturally infected foals (age: 7 months; BW: 100-120 kg) from the autochthonous Pura Raza Galega and Pura Raza Asturcon breeds were used to test a ML pour-on commercially available for cattle, IVM (0.5% w/v, Noromectin, Norbrook Laboratories Ltd, Carlisle, Cumbria, England, UK).

These animals are maintained outdoors where they graze freely on natural pastures characterized by annual grass species, and supplementation is seldom provided by their owners. The main benefit that these horses provide is based on reducing the unwanted vegetation, and very few economic benefits can be achieved by meat production; therefore, insufficient feeding and veterinary attention are often provided.

For the duration of the study, the foals were confined indoors to stables and fed with wheat straw and barley.

2.2. Experimental Design

Between September and October 2009, two experiments were carried out. In the first, the efficacy of two doses of IVM topically administered was evaluated, and the results compared with that obtained after the oral administration of the ML. In all, 48 foals were distributed into four groups with each containing 12: F-Eq0.2 (0.2 mg/kg BW Eqvalan through oral administration; IVM 1.87%, Merial, Spain), F-Nor0.5 (0.5 mg/kg BW of IVM pour-on), F-Nor1 (1 mg/kg BW of IVM pour-on), and F-Control (untreated foals). The weight was calculated by using a girth tape. Deworming of the foals was performed on day 4 of the study.

A second trial was conducted to assess the variations in different biochemical and enzymatic blood parameters after the administration of the IVM, as demonstrated in Table 2. For practical reasons and by taking into account the results from the experiment 1, the F-Control, F-Eq0.2, and F-Nor1 groups were considered in this assay.

2.3. Sampling

Foals in the present investigation were sampled by introducing them into a chute, and then later were returned back to the stables.

Six samples of feces and blood were obtained during 20 days. In all cases, feces were individually collected from the rectum in each foal, and fecal egg counts (FEC) performed using a McMaster-modified technique based on 5 g of feces with a minimum detection level of 10 eggs per gram of feces [5]. Strongyles were identified after the feces samples were cultured at 25°C for 15 days [12].

The routine probe for the detection of infection by pinworms is based on the perianal tape test because the adult female worms crawl partly out of the anus to deposit their eggs on the adjacent surface. The eggs hatch outside of the horse's body, fall to the ground, and wait for their next host. However, when feces are individually collected from the rectum in each foal, the collecting gloves become contaminated easily, suggesting that pinworm eggs are present in the feces and can be detected by the flotation probe.

The laboratory technician conducting the microscopic analysis was blinded to the group origin of each sample.

Blood samples were obtained by jugular puncture and sera analyzed by using commercial kits (IDEXX, Barcelona, Spain) along with a biochemical autoanalyzer (VetTest Chemistry Analyzer, IDEXX).

2.4. Deworming Efficacy

The efficacy of the treatment was determined by calculating the reduction in the FEC values (fecal egg count reduction, FECR) and in the percentage of positive horses (positive horse reduction, PHR) as follows:

$$\text{FECR (\%)} = [1 - (\text{FEC}_{\text{treated}} / \text{FEC}_{\text{controls}})] \times 100$$

$$\text{PHR (\%)} = [1 - (\text{number of positive horses}_{\text{treated}} / \text{number of positive horses}_{\text{controls}})] \times 100$$

Arithmetic means for each group were determined from individual FECR [13].

2.5. Statistical Analysis

By considering that the eggs distribution is not normal, the values for the egg shedding in the feces were expressed as the median and the range, and analyzed by means of the nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* two-sided tests ($\alpha = 0.05$), and significant differences were considered when $P < .05$ [14].

Data from biochemical and enzymatic serum activity tests were analyzed by means of an analysis of variance.

The possible correlation between the egg output and the values for the blood parameters was assessed by using the Pearson test.

2.6. Evaluation of Safety and Ease of Application

All of the treated horses were examined for the appearance of changes on the coat and/or the skin color after the topical administration of the ML. Special attention was given to the presence of loss of pigmentation, hairless or thin-haired areas, white spots, ulcers, erosions, or any kind of skin injury.

The ease of application was estimated by measuring the time required for the administration of the antiparasitic drugs to each horse.

3. Results

The copromicroscopical analysis showed that the feces samples collected from the foals contained eggs from *Parascaris*, strongyles, and *Oxyuris equi*. Larvae belonging to the cyathostomin genera *Cyathostomum* and *Gyalocephalus* spp were identified in the coprocultures.

3.1. Experiment 1

No significant differences in the egg output of ascarids, cyathostomins, or pinworms were obtained before the administration of the ML. The observation of *Parascaris* eggs in the feces ended 4 days after the treatment after both the oral and topical IVM applications (Table 1). The FECR and PHR values were 100% from this day.

Eggs of strongyles were not found 4 days after the treatment for the F-Eq0.2 group and 8 days after the treatment for the F-Nor1 group; therefore, a 100% value was obtained for the FECRs and PHR. The fecal analyses in the foals receiving 0.5 mg/kg BW of IVM pour-on remained positive throughout the study (Table 1). In the F-Nor0.5 group, the FECRs ranged from 19% to 86%, whereas the highest PHR percentage was 33%.

The elimination of eggs of pinworms ceased 4 days after the oral administration of IVM and 8 days after the topical application of the ML (F-Nor0.5 and F-Nor1). A 100% value was obtained for the FECRs and PHR.

3.2. Experiment 2

Data collected from the study of several biochemical and enzymatic serum indicators belonging to the groups F-Eq0.2, F-Nor0.5, and F-Nor1 are presented in Table 2. Values not within the normal range for the creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were achieved throughout the trial, whereas for the total proteins, albumin, and globulins during the first 8 days.

Before the treatment, no differences among the groups of foals were demonstrated. In the group containing infected untreated foals (F-Control), a positive significant correlation between the numbers of ascarids egg output and the levels of aspartate aminotransferase and CK ($\rho = 0.300$, $P = .028$ and $\rho = 0.346$, $P = .009$, respectively), and between the cyathostomin FECs and the LDH ($\rho = 0.453$, $P = .001$) was assessed throughout the study.

After the administration of IVM, either through oral route or pour-on, the levels of blood urea nitrogen, creatinine, total proteins, albumin, globulins, and LDH remained significantly higher in the control group as compared with the treated groups (F-Eq0.2 and F-Nor1), but values not within the normal range were only obtained for LDH.

Although the values of creatinine, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase were significantly higher in the F-Eq0.2 group as compared with the F-Nor1 group (Table 2), these indicators were within the normal range.

In the two treated groups, there was a significantly positive correlation between the numbers of cyathostomin egg output and the LDH levels ($\rho = 0.806$, $P = .001$ for the F-Eq0.2 group and $\rho = 0.836$, $P = .001$ for the F-Nor1 group).

3.3. Undesirable Effects and Ease of Application

Clinically, no adverse reactions on the skin, alopecia, or depigmentation in the horses receiving the ML were observed. No ulcers or skin injury was noted in any of the horses receiving the antiparasitic drugs.

The pour-on application of the ML took an average duration of 45 ± 10 seconds for every foal, and the oral administration took 5 minutes ± 30 seconds.

4. Discussion

Infection by parasitic nematodes, such as ascarids, strongyles, or pinworms, is very frequent in grazing horses because their infective stages can be ingested when feeding in pastures [15]. Despite an integrated strategy based on the combination of measures against the presence of free-living stages in the environment and on the requirement of a definitive host for getting successful results, most of the control programs are based on the administration of different anthelmintics only.

Among several products commercially available (benzimidazoles, MLs, pyrantel), IVM (given orally) is one of the most widely used parasiticide for the deworming of horses. In the present investigation, one group of naturally infected foals was dewormed with the recommended oral dosage of IVM (0.2 mg/kg BW). The egg output of *Parascaris*, cyathostomins, and *Oxyuris* ceased 4 days after the treatment, which is in agreement with previous investigations and points out the efficacy of the ML [13].

Deworming of horses requires for a correct immobilization so as to ensure that the right anthelmintic dosage is received, and to avoid the risk of injury equally to both, the veterinarian and the animal [5,11]. Although domestic equines do not represent a problem, the opposite occurs when managing wild species. In many such situations, the low economical input that the indigenous horses provide, together with the difficulty faced in the application of any parasiticide, dissuade the owners from implementing measures for parasite control, which in turn reduces both the horses' sanitary status and the afforded benefits.

With the aim to offer a possible solution for the control of endoparasites in indigenous horses, the efficacy of two doses of IVM pour-on was assessed among grazing foals. After trying the recommended dosage for cattle (0.5 mg/kg BW), successful results against *Parascaris* and *Oxyuris* were

Table 1
Values of egg output, FECR, and PHR in naturally parasitized indigenous foals (n = 12/group)

Days after treatment	Group	Statistics	Ascarids			Strongyles			Pinworms		
			EPG	FECR	PHR	EPG	FECR	PHR	EPG	FECR	PHR
-4	F-Control	Me	175			475			425		
		R	100			50			250		
	F-Eq0.2	Me	125			350			200		
		R	200			250			250		
	F-Nor0.5	Me	200			350			250		
		R	280			450			300		
F-Nor1	Me	150			425			125			
	R	200			150			100			
0	F-Control	Me	275			400			225		
		R	200			100			250		
	F-Eq0.2	Me	125	55	0	325	19	0	150	33	0
		R	250			100			300		
	F-Nor0.5	Me	200	66	0	325	19	0	100	56	0
		R	240			450			150		
F-Nor1	Me	112.5	59	0	400	0	0	175	22	0	
	R	200			250			350			
4	F-Control	Me	150			500			125		
		R	100			100			150		
	F-Eq0.2	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100
		R	0			0			0		
	F-Nor0.5	Me	0	100	100	115	77	8	100	20	25
		R	0			100			200		
F-Nor1	Me	0	100	100	75	85	25	125	0	25	
	R	0			50			50			
8	F-Control	Me	150			375			125		
		R	250			300			200		
	F-Eq0.2	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100
		R	0			0			0		
	F-Nor0.5	Me	0	100	100	75	86	17	0	100	100
		R	0			150			0		
F-Nor1	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100	
	R	0			0			0			
12	F-Control	Me	75			400			100		
		R	200			150			200		
	F-Eq0.2	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100
		R	0			0			0		
	F-Nor0.5	Me	0	100	100	125	76	33	0	100	100
		R	0			150			0		
F-Nor1	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100	
	R	0			0			0			
16	F-Control	Me	100			525			75		
		R	100			200			100		
	F-Eq0.2	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100
		R	0			0			0		
	F-Nor0.5	Me	0	100	100	150	51	33	0	100	100
		R	0			200			0		
F-Nor1	Me	0	100	100	0	100	100	0	100	100	
	R	0			0			0			

FECR, fecal egg count reduction; PHR, positive horse reduction; EPG, eggs per gram of feces; F-Control, untreated; F-Eq0.2, 0.2 mg/kg BW of oral IVM; F-Nor0.5, 0.5 mg/kg BW of IVM pour-on; F-Nor1, 1 mg/kg BW of IVM pour-on; Me, median; R, range.

achieved, but strongyle eggs survived throughout the study. These results are in agreement with a previous investigation in which the inefficacy to reduce the fecal elimination of strongyle eggs in horses that were naturally infected was demonstrated [16]. In a recent work [11], an 82% to 97% reduction in the FECs with the same dose was achieved, and a lower bioavailability of the topical preparation as compared with the oral paste was recorded, possibly because of binding to the hair, degradation at the site of application, and biotransformation of the drug in the skin.

When testing a dose of 1 mg/kg BW of IVM for the deworming of naturally parasitized foals, a 100% FECR was obtained for the ascarids, cyathostomins, and pinworms 4 to 8 days after the treatment, resembling the efficacy of

this dosage [17,18]. A significant increase in erythrocytes, hemoglobin, and packed cell volume after the pour-on application of this dosage to horses naturally infected with cyathostomins has been previously reported [5], and a period of egg reappearance of 7 weeks has also been reported, which highlights the success of this formulation [19].

A second trial was performed in the present investigation to analyze the effect of the IVM on several biochemical and enzyme serum parameters indicators. According to the results achieved in the experiment 1, the sera from three groups of naturally infected foals (untreated, 0.2 mg/kg BW of oral IVM, and 1 mg/kg BW of topical IVM) were analyzed. Only CK and LDH exceeded normal ranges throughout the study, and a positive significant correlation between the cyathostomins FECs and LDH activity was also

Table 2
Serum values of the biochemical parameters measured in naturally parasitized indigenous foals (n = 12/group)

Days after treatment	Group	Statistics	BUN (10-25) (mg/dL)	CREA (0.8-2.2) (mg/dL)	CA (10.4-12.9) (mg/dL)	TP (5.6-7.9) (g/dL)	ALB (1.9-3.2) (g/dL)	GLOB (2.4-4.8) (g/dL)	AST (100-600) (U/L)	ALKP (10-326) (U/L)	γ-GT (0-87) (U/L)	TBIL (0-3.5) (mg/dL)	CK (10-350) (U/L)	LDH (250-2,070) (U/L)
-4	F-Control	Mean	22.50	1.40	12.40	8.70	3.75	4.85	327.00	249.50	45.00	0.75	375.50	2,079.00
		SD	2.89	0.12	0.58	0.35	0.29	0.06	43.88	110.27	15.01	0.29	61.78	117.78
	F-Eq0.2	Mean	24.88	1.35	11.18	8.73	3.98	4.63	342.67	271.00	39.33	1.73	356.00	2,108.33
		SD	4.22	0.05	1.21	2.13	0.64	0.85	56.12	67.03	10.78	1.45	51.59	709.74
	F-Nor1	Mean	24.88	1.33	11.70	8.13	3.56	4.70	303.75	199.75	43.25	1.08	461.00	2,094.67
		SD	2.03	0.28	0.53	0.16	0.25	0.26	42.31	46.00	12.17	0.38	146.58	159.26
0	F-Control	Mean	24.00	1.55	10.48	8.40	3.55	4.85	462.00	281.00	48.00	1.45	563.00	2,180.50
		SD	1.15	0.06	1.56	0.00	0.17	0.17	112.01	1.15	5.77	0.29	214.77	71.01
	F-Eq0.2	Mean	22.25	1.48	10.85	7.53	3.30	4.75	501.25	275.75	45.75	1.28	539.00	2,199.00
		SD	5.31	0.16	1.58	0.93	0.29	0.92	134.08	60.14	17.39	0.69	123.27	188.49
	F-Nor1	Mean	23.00	1.39	10.50	7.83	3.29	4.68	368.50	195.50	41.25	1.80	635.25	2,148.88
		SD	2.00	0.20	1.26	0.23	0.10	0.19	41.91	37.44	6.56	0.41	210.59	297.89
4	F-Control	Mean	22.50	1.40	10.75	7.65	3.33	4.75	412.00	270.75	40.00	0.70	504.50	2,194.00
		SD	1.73	0.12	0.83	0.06	0.17	0.17	103.92	6.65	3.46	0.12	222.28	54.28
	F-Eq0.2	Mean	19.50	1.35	11.03	7.90	3.05	4.35	484.25	290.50	40.00	1.15	360.75	1,794.25
		SD	5.37	0.19	0.85	1.52	0.12	1.11	122.50	114.78	18.72	0.76	124.49	77.58
	F-Nor1	Mean	20.38	1.33	10.45	7.43	2.85	4.58	334.25	185.25	35.00	1.00	480.75	1,768.25
		SD	2.83	0.07	0.73	0.23	0.18	0.22	40.16	24.77	6.41	0.31	117.09	268.74
8	F-Control	Mean	20.75	1.28	12.35	7.55	3.13	4.60	413.00	290.50	44.50	0.35	482.50	2,084.67
		SD	2.50	0.10	0.06	0.06	0.15	0.00	120.09	14.43	6.35	0.06	239.60	214.57
	F-Eq0.2	Mean	17.00	1.23	11.88	6.88	2.88	4.00	396.75	290.00	46.50	0.48	365.00	1,812.75
		SD	4.11	0.18	0.59	0.89	0.21	0.76	73.59	61.13	17.01	0.18	48.02	109.35
	F-Nor1	Mean	17.38	1.08	12.23	7.50	2.95	4.55	329.00	231.25	43.00	0.53	398.75	1,806.75
		SD	3.81	0.22	0.24	0.20	0.40	0.22	52.86	42.64	9.83	0.23	152.20	483.44
12	F-Control	Mean	22.50	1.35	11.45	7.25	3.20	4.30	385.50	287.00	40.00	0.55	370.50	2,170.00
		SD	1.00	0.06	0.40	0.06	0.42	0.12	109.12	9.24	10.39	0.06	35.22	131.64
	F-Eq0.2	Mean	17.50	1.43	10.98	7.05	2.98	4.10	423.00	268.75	38.75	1.13	357.00	1,715.00
		SD	4.57	0.16	0.84	0.82	0.21	0.68	102.93	36.80	16.39	0.35	96.79	266.71
	F-Nor1	Mean	19.25	1.20	10.80	7.30	2.83	4.50	337.00	221.00	35.25	0.93	436.00	1,616.75
		SD	1.49	0.20	1.24	0.20	0.25	0.11	59.07	52.33	9.87	0.16	174.57	502.81
16	F-Control	Mean	20.00	1.35	11.45	7.25	3.30	4.30	385.50	287.00	40.00	0.55	343.75	2,092.25
		SD	2.31	0.06	0.40	0.06	0.34	0.12	109.12	9.24	10.39	0.06	19.53	194.00
	F-Eq0.2	Mean	17.50	1.43	10.98	7.05	2.95	4.10	423.00	268.75	38.75	1.13	332.00	1,715.00
		SD	4.57	0.16	0.84	0.82	0.21	0.68	102.93	36.80	16.39	0.35	96.79	266.71
	F-Nor1	Mean	18.13	1.20	10.80	7.30	2.83	4.50	337.00	221.00	35.25	0.93	356.05	1,616.75
		SD	1.46	0.20	1.24	0.20	0.25	0.11	59.07	52.33	9.87	0.16	174.57	502.81

BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; CA, calcium; TP, total proteins; ALB, albumin; AST, aspartate aminotransferase; ALKP, alkaline phosphatase; γ-GT, gamma glutamyltransferase; TBIL, total bilirubin; CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase. Manufacturer reference values are given within parentheses.

demonstrated. The increment in the serum concentrations of alkaline phosphatase and LDH has been related to the injury on the intestinal mucosa [20]. After the L3 cyathostomins exsheath in the gut lumen and enter the mucosa, two possibilities may occur: (1) larvae moult to L4, return to the lumen, and develop to adult stages, or (2) L3 arrest their development until appropriate stimuli [21]. The penetration–emergence cycle of the larval stages causes mucosal damage, which worsens when the adult worms feed [22], thus explaining the elevated levels of LDH observed in the infected untreated foals during the trial.

In the present research, the FECs of ascarids have been correlated to the levels of CK. Infection with the roundworm *Parascaris equorum* is extremely common in foals and yearlings [9]. The adult worms in the small intestine injure the mucosa and compete for nutrients. However, an understandable explanation of the association between the presence of ascarids and the increases in CK levels has still not been found because of which this enzyme has been associated with muscle injury [23].

5. Conclusions

The damage caused by cyathostomins at the gut level may be assessed by measuring the levels of the LDH activity.

The topical application of a 1 mg/kg BW IVM dose provides very effective results against the intestinal parasites infecting grazing horses. By taking into account the ease and safety of administration, this formulation is strongly advised for deworming of horses under an extensive regime or in cases when their correct immobilization is not possible.

Acknowledgments

The authors are in debt to Mrs B. Valcárcel for preparing and editing the manuscript. They thank the Spanish equine associations Pura Raza Galega PURAGA, *Cabalo de Pura Raza Galega*, “Granxa do Souto,” Grupoportichol, and Asociación del Caballo Pura Raza Asturcón.

This work was supported, in part, by the Research Funds XUGA PGIDT06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain), and no involvement in the design, collection, analysis of data, writing, or decision to submit the article has been recorded.

Conception and design of the study: I.F., J.L.S., M.A., P.M., R.S.A., A.P.S.; acquisition of data: I.F., J.A.S., F.J.C., R.F., J.S., C.C.; analysis and interpretation of data: I.F., J.L.S., M.A., P.M., R.S.A., A.P.S.; redaction and revision of the article: M.A., P.M., R.S.A., A.P.S.; final approval of the version to be submitted: I.F., J.A.S., F.J.C., R.F., J.S., C.C., J.L.S., M.A., P.M., R.S.A., A.P.S.

References

[1] Pereira JR, Vianna SS. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2006;140:289-95.

[2] Francisco I, Arias M, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Sánchez JA, et al. Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. *Vet Parasitol* 2009;164:357-62.

[3] Martin-Downum K, Yazwinski T, Tucker C, Fincher M, Ralph J, Hamilton J. Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. *Vet Parasitol* 2001;101:75-9.

[4] Hennessy DR. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol* 1997;72:367-82.

[5] Francisco I, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Arias M, et al. Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. *Equine Vet J* 2009;41:713-5.

[6] Barrett EJ, Farlam J, Proudman CJ. Field trial of the efficacy of a combination of ivermectin and praziquantel in horses infected with roundworms and tapeworms. *Vet Rec* 2004;154:323-5.

[7] Boersema JH, Eysker M, Maas J, van der Aar WM. Comparison of the reappearance of strongyle eggs on foals, yearlings and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *Vet Q* 1996;18:7-9.

[8] Monahan CM, Klei TR. The use of macrocyclic lactones to control parasites of horses. In: Vercruyse J, Rew RS, editors. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. New York, NY: CABI; 2002.

[9] von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann S, Rohn K, Schnieder T, et al. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 2007;144:74-80.

[10] Edward CL, Hoffmann AA. Ivermectin resistance in a horse in Australia. *Vet Rec* 2008;162:56-7.

[11] Gokbulut C, Cirak VY, Senlik B, Aksit D, Durmaz M, McKellar QA. Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. *Vet Parasitol* 2010;170:120-6.

[12] Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Sommer C, Ito M. Key characters for the microscopical identification of *Cylicocyclus nassatus* and *Cylicocyclus ashworthi* (Nematoda: Cyathostominae) of the horse, *Equus caballus*. *J Helminthol Soc Wash* 1997;64:120-7.

[13] Larsen ML, Ritz C, Petersen SL, Nielsen MK. Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *Vet J* (in press).

[14] Francisco I, Arias M, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Dacal V, et al. Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain). *J Parasitol Res* 2009. pii: 616173.

[15] Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS. Study (1991 to 2001) of drug-resistant population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitol Res* 2007;101:689-701.

[16] Dornbusch PT, Michelotto PV, Santarém VA, De carli LM, Camargo CE, Biava JS. Eficácia anti-helmíntica da ivermectina “pour-on” comparada com a formulação oral em gel nos eqüinos. *Rev Acad Curitiba* 2006;4:21-4.

[17] Pook JF, Power ML, Sangster NC, Hodgson JL, Hodgson DR. Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes. *Vet Parasitol* 2002;106:331-43.

[18] Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006;136:167-85.

[19] Borgsteede FH, Boersema JH, Gaasenbeek CP, Vanderburg WP. The reappearance of eggs in feces of horses after treatment with ivermectin. *Vet Q* 1993;15:24-6.

[20] Reeder D, Miller S, Wilfong DA, Zimmer D. *AAEVT's Equine Manual for Veterinary Technicians*. Iowa: John Wiley and Sons; 2009.

[21] Brianti E, Giannetto S, Traversa D, Chirgwin SR, Shakya K, Klei TR. In vitro development of cyathostomin larvae from the third stage larvae to the fourth stage: morphologic characterization, effects of refrigeration, and species-specific patterns. *Vet Parasitol* 2009;163:348-56.

[22] Corning S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasit Vectors* 2009;2(Suppl 2):S1.

[23] Rose RJ, Hodgson DR. *Manual of equine practice*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2000.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., MULA, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. **Equine Veterinary Journal**, 41: 713-715.

EQUINE VETERINARY JOURNAL
Equine vet. J. (2009) 41 (7) 713-715
 doi: 10.2746/042516409X447275

Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses

I. FRANCISCO, J. A. SÁNCHEZ, F. J. CORTIÑAS, R. FRANCISCO, E. MOCHALES, M. ARIAS, P. MULA[†], J. L. SUÁREZ, P. MORRONDO, P. DÍEZ-BAÑOS, R. SÁNCHEZ-ANDRADE and A. PAZ-SILVA*

Animal Pathology Department, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002-Lugo, Spain; and [†]Departamento di Biologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sardinia, Italy.

Keywords: horse; endoparasites; anthelmintic therapy; grazing horses; ivermectin, pour-on; indigenous; Pura Raza Galega

Summary

The aim of this study was to assess, by a clinical trial, the efficacy of an ivermectin-based pour-on treatment against gastrointestinal parasitic nematodes in naturally infected horses using 2 groups of mature indigenous Pura Raza Galega grazing mares. Faecal and blood samples were collected individually over a 21 week period. Faeces were analysed by the coprological flotation, sedimentation and migration techniques. Changes in circulating blood cells were monitored over the study period.

The administration of the ivermectin suppressed the egg-elimination of ascarids and pinworms throughout the study and no strongyle-eggs were observed in the treatment group between the 3rd and 10th weeks. The numbers of red cells increased significantly after the anthelmintic therapy, and a statistical reduction in circulating leucocytes was recorded. No side effects were observed. The pour-on ivermectin formulation was highly successful against gastrointestinal nematodes and appears to be a useful therapeutic routine for large groups of horses.

Introduction

Grazing or silvopasturing (combining forestry and grazing of domesticated animals in a mutually beneficial way) horses have a high probability of simultaneous infection with various endoparasites (Pereira and Vianna 2006; Francisco *et al.* 2007). Most endoparasite control programmes rely on prophylactic use of anthelmintic drugs but individual administration to feral grazing equids is problematic in practice.

Ivermectin given to horses orally, as a paste or liquid at 0.2 mg/kg bwt, is highly effective (95–100%) against adult and most fourth-stage larvae of cyathostomes, large strongyles, ascarids, pinworms, stomach worms, threadworms and lungworm (Barrett *et al.* 2004). Although an i.m. formulation was used originally, the oral formulations are the only preparations now approved for use in horses.

Currently available pour-on preparations are licensed only for use in cattle, sheep and pigs. The main goal in the current investigation was to assess the efficacy of the pour-on ivermectin formulation in a field trial carried out in Spain. For this purpose, 2 groups of indigenous Pura Raza Galega (PRG) grazing horses were used.

Materials and methods

Experimental design

A herd of 12 mature indigenous PRG mares was used: *Group 1* (n = 8) received one dose of commercially available ivermectin pour-on for cattle (Noromectin)¹ at 1 mg/kg bwt and *Group 2* (n = 4) were untreated as controls. Faecal and blood samples were collected individually weekly for 15 weeks. Faeces were processed (in duplicate) by the flotation, sedimentation and migratory techniques (Anon 1986), with a sensitivity of 10 eggs/g of faeces (EPG). The laboratory technician conducting the microscope analysis (P. Mula) was blinded to the group origin of each sample.

Blood samples were analysed by means of an automated Lasser-Cyte² Coulter counter and variations in red (erythrocyte, packed cell volume [PCV], haemoglobin) and white (total leucocyte count, percentage of lymphocytes, granulocytes and monocytes) blood parameters evaluated.

The efficacy of treatment was determined by calculating the reduction in the percentage of positive horses (positive horse reduction, PHR) and of the values of egg-elimination (faecal egg count reduction, FECR):

$$\text{PHR} = 1 - \frac{\text{Percentage of positive Group 1 horses}}{\text{Percentage of positive Group 2 horses}} \times 100$$

$$\text{FECR} = 1 - \frac{\text{Egg-excretion in Group 1 horses}}{\text{Egg-excretion in Group 2 horses}} \times 100$$

Statistical analysis was done by mean of the nonparametric Mann-Whitney U 2-sided tests ($\alpha = 0.05$), and significant differences were considered when $P < 0.05$.

*Author to whom correspondence should be addressed.
 [Paper received for publication 19.02.09; Accepted 21.03.09]

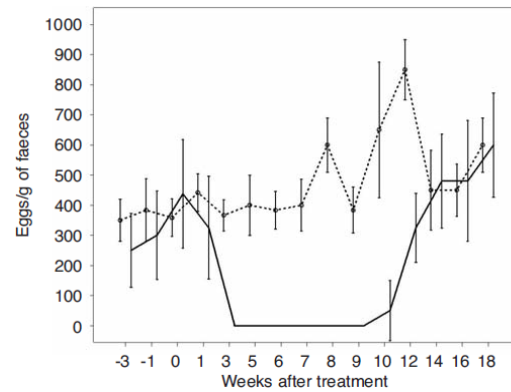


Fig 1: Dynamics of strongyle egg-output in indigenous PRG horses. (---) Group 1: horses treated with ivermectin pour-on; (—) Group 2: horses remaining untreated as controls. Results are expressed as mean and bars are the s.d.

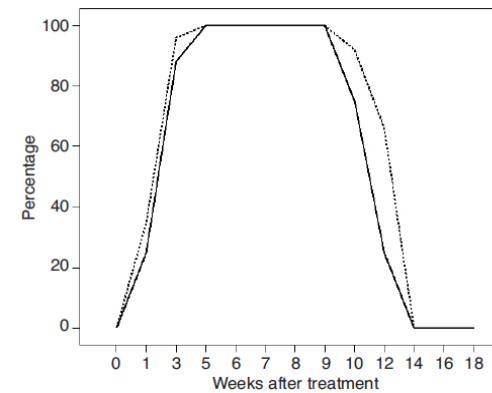


Fig 2: Analysis of the efficacy of ivermectin pour-on against strongyles. (---) PHR: percentage of reduction of the positive horses; (—) FECR: faecal egg-count reduction.

TABLE 1: Changes in the blood parameters in indigenous PRG horses. Group 1: horses treated with ivermectin pour-on; Group 2: horses remaining untreated as controls. Results are expressed as mean \pm s.d.

a) Red cell parameters						
Weeks after treatment	Erythrocytes (cells 10^6 /ml)		Haemoglobin (g/l)		Packed cell volume (%)	
	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1
-3	8.17 \pm 0.46	7.92 \pm 0.72	137.0 \pm 12.2	136.8 \pm 8.1	48.19 \pm 2.21	45.16 \pm 2.58
-1	7.71 \pm 1.05	7.60 \pm 0.75	131.0 \pm 10.5	122.8 \pm 12.6	35.82 \pm 2.52	41.34 \pm 3.83
0	7.97 \pm 1.25	7.67 \pm 0.66	139.0 \pm 11.7	134.3 \pm 12.5	37.12 \pm 3.14	39.90 \pm 2.87
1	7.79 \pm 0.68	8.75 \pm 0.76	13.80 \pm 1.06	130.5 \pm 10.2	37.38 \pm 2.23	42.58 \pm 2.81
3	7.48 \pm 0.82	8.86 \pm 0.48	127.0 \pm 11.8	154.3 \pm 12.3	35.87 \pm 2.68	43.10 \pm 2.74
5	7.75 \pm 0.91	9.15 \pm 0.56	130.0 \pm 10.9	146.3 \pm 7.9	37.90 \pm 2.74	46.80 \pm 3.92
6	6.06 \pm 0.48	8.58 \pm 0.84	113.0 \pm 9.2	157.3 \pm 13.4	35.51 \pm 3.27	39.89 \pm 3.84
7	7.04 \pm 0.63	9.07 \pm 0.72	131.0 \pm 9.4	170.0 \pm 10.9	34.93 \pm 2.94	55.73 \pm 2.60
8	6.62 \pm 0.87	9.21 \pm 0.87	128.0 \pm 8.1	166.8 \pm 8.5	35.98 \pm 2.87	42.74 \pm 2.18
9	6.83 \pm 0.74	9.47 \pm 0.64	116.0 \pm 11.3	153.3 \pm 10.2	35.00 \pm 2.86	45.35 \pm 2.54
10	7.43 \pm 0.73	9.54 \pm 0.96	112.0 \pm 12.4	158.0 \pm 13.7	32.14 \pm 2.91	36.63 \pm 3.80
12	7.73 \pm 0.65	8.87 \pm 0.67	115.0 \pm 9.3	153.3 \pm 11.4	33.89 \pm 2.75	32.06 \pm 3.36
14	7.30 \pm 1.02	8.50 \pm 0.83	125.0 \pm 7.5	153.0 \pm 10.7	36.40 \pm 2.84	45.02 \pm 2.58
16	7.49 \pm 1.11	8.37 \pm 0.72	116.0 \pm 8.2	141.7 \pm 10.7	31.30 \pm 2.51	39.47 \pm 2.31
18	7.52 \pm 0.95	7.84 \pm 0.61	125.6 \pm 7.8	131.7 \pm 12.2	31.30 \pm 2.77	39.47 \pm 2.74
F		66.628		48.791		33.375
P		0.001		0.001		0.001

b) White cell parameters								
Weeks after treatment	Leucocytes (cells 10^9 /l)		Lymphocytes (%)		Granulocytes (%)		Monocytes (%)	
	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1
-3	11.55 \pm 1.21	10.58 \pm 0.97	41.80 \pm 8.52	41.23 \pm 9.01	55.10 \pm 7.32	55.8 \pm 8.34	3.10 \pm	2.97 \pm 1.4
-1	11.32 \pm 0.94	10.92 \pm 0.85	41.50 \pm 7.43	39.25 \pm 9.00	56.00 \pm 7.25	56.83 \pm 6.74	2.50 \pm	3.92 \pm 2.7
0	9.55 \pm 0.89	9.78 \pm 0.76	41.40 \pm 9.21	33.68 \pm 8.37	54.9 \pm 8.41	61.85 \pm 9.07	3.70 \pm	4.48 \pm 1
1	10.05 \pm 1.05	10.26 \pm 0.77	41.90 \pm 9.15	39.43 \pm 10.84	53.3 \pm 6.33	57.53 \pm 11.07	4.80 \pm	3.05 \pm 1.76
3	10.55 \pm 1.15	8.36 \pm 1.05	38.80 \pm 8.25	38.30 \pm 9.50	55.4 \pm 8.57	57.38 \pm 9.50	5.80 \pm	4.32 \pm 0.70
5	11.57 \pm 0.97	7.89 \pm 1.18	43.90 \pm 8.54	45.00 \pm 9.16	51.8 \pm 8.49	51.98 \pm 6.24	4.30 \pm	3.02 \pm 1.28
6	9.51 \pm 0.92	7.06 \pm 0.85	40.70 \pm 9.41	32.48 \pm 10.03	56.3 \pm 7.22	64.45 \pm 7.11	3.00 \pm	3.08 \pm 1.6
7	10.51 \pm 1.12	6.54 \pm 1.03	44.90 \pm 9.17	33.73 \pm 6.30	52.6 \pm 7.62	60.93 \pm 7.64	2.50 \pm	5.35 \pm 1.02
8	9.61 \pm 1.15	7.72 \pm 1.17	49.10 \pm 7.98	36.93 \pm 7.58	46.6 \pm 8.14	59.17 \pm 6.45	4.30 \pm	3.90 \pm 0.94
9	10.60 \pm 1.24	8.51 \pm 1.17	46.90 \pm 7.85	40.15 \pm 8.45	49.8 \pm 7.21	54.58 \pm 8.43	3.30 \pm	4.37 \pm 1.41
10	10.76 \pm 1.08	9.03 \pm 1.14	44.40 \pm 8.52	38.23 \pm 6.94	49.3 \pm 7.74	57.28 \pm 6.42	6.30 \pm	4.49 \pm 0.67
12	10.66 \pm 0.92	9.95 \pm 1.6	41.70 \pm 8.69	33.73 \pm 9.74	55.7 \pm 8.12	63.60 \pm 9.17	2.60 \pm	2.68 \pm 1.32
14	10.10 \pm 0.84	9.63 \pm 1.41	36.30 \pm 7.45	37.23 \pm 7.15	59.4 \pm 8.06	56.90 \pm 7.53	4.30 \pm	5.88 \pm 0.75
16	9.80 \pm 1.23	9.67 \pm 0.85	38.30 \pm 7.43	34.20 \pm 6.71	57 \pm 7.25	63.10 \pm 8.32	4.70 \pm	2.70 \pm 1.56
18	8.80 \pm 0.97	9.67 \pm 0.76	42.50 \pm 8.22	37.60 \pm 7.16	52.7 \pm 7.87	59.10 \pm 8.04	4.80 \pm	3.30 \pm 1.21
F		34.296		8.409		2.746		0.834
P		0.001		0.005		0.101		0.363

The existence of correlation among the different parameters was assessed by using the nonparametric Spearman's rank correlation test. All tests were done using SPSS for Windows (15.0).

Results

Prior to treatment, eggs from gastrointestinal nematoda were only observed in the faeces, with no coccidian or eggs from trematoda, cestoda or lungworm larvae detected.

The analysis of the gastrointestinal eggs showed that the horses were parasitised by *Parascaris equorum*, Strongyles and *Oxyuris equi*.

The administration of the ivermectin suppressed the excretion of eggs of *Parascaris* and *Oxyuris* in the faeces from one week after treatment to the end of the study.

The strongyle egg-output reduced 3 weeks after treatment (Fig 1). No eggs were observed in the faeces between the 3rd and 9th weeks after treatment and positive coprological results from the 10th week after treatment were recorded. ANOVA showed significant differences in the egg-excretion of strongyles between the 2 groups of horses ($F = 12.326$, $P = 0.001$).

Figure 2 shows the values for the PHR and FECR estimations. The range of percentage of positive horses following administration of ivermectin was 25–100% during the first 12 weeks after treatment, whereas the reduction in faecal egg count varied between 35% and 100% for that period.

Variations in the blood parameters are represented in Table 1. A significant increase in erythrocytes, haemoglobin and PCV after the pour-on application of ivermectin was recorded (Table 1a). Striking differences from the 5th to the 12th week after treatment were noted. Table 1b shows the significant reduction in the values of circulating leucocytes after treatment ($P < 0.05$). The percentage of lymphocytes decreased in the horses of Group 2, while the values of granulocytes increased in these animals after the application of ivermectin. The percentage of monocytes varied throughout the study. Statistical differences were obtained only for the lymphocytes following treatment ($P < 0.05$).

The nonparametric Spearman's rank test showed a significant and negative correlation between the strongyle egg-excretion and values of erythrocytes ($r^2 = -0.567$, $P = 0.001$), haemoglobin ($r^2 = -0.540$, $P = 0.001$) and PCV ($r^2 = -0.524$, $P = 0.001$). In addition, a positive and significant correlation between the egg-elimination and the values of leucocytes ($r^2 = 0.360$, $P = 0.001$) and lymphocytes ($r^2 = 0.322$, $P = 0.001$) was shown. No side effects were observed in the horses receiving the parasiticide.

Discussion

Ivermectin pour-on formulation offers several potential advantages over oral pastes, primarily ease of administration and attenuation on animal stress (Laffont *et al.* 2003). Nevertheless, few investigations into the efficacy of an ivermectin pour-on formulation in horses have been carried out. In the current investigation the ivermectin pour-on ended the excretion of *Parascaris* and *Oxyuris* eggs by faeces one week after treatment. The strongyle egg-excretion was suppressed between the 3rd and 10th weeks after treatment.

The adverse effects of the helminth infection in grazing horses were demonstrated in the present study by the observation of a significantly negative correlation between the numbers of

strongyle eggs passed in faeces and the values of erythrocytes, haemoglobin and PCV in peripheral blood. The significance of horses maintained under semi-extensive or extensive conditions is becoming very important due to their role in the economic control of weeds and brush and in the reduction of vegetation considered to be a fire risk (Loehle 2004).

The valuable effect of grazing horses on unwanted vegetation can be severely reduced when horses are parasitised, but anthelmintic treatment of horses in extensive management systems is very difficult, due to the difficulty in immobilisation of the animals for the administration of commercially available oral or injectable parasiticides.

The results showed good efficacy of an ivermectin pour-on treatment against equine parasitic nematodes and its beneficial effect on the red blood parameters of pasturing horses. Ivermectin pour-on is easy to apply and, therefore, a very useful aid in the control of endoparasites in grazing horses.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by research grants from the Xunta de Galicia (XUGA, Spain) to both I. Francisco and R. Francisco, and by the Projects XUGA PGIDT06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain), and complies with the current laws for Animal Health Research in Spain. We are in debt to Mrs B. Valcárcel for preparing and editing the manuscript.

Manufacturers' addresses

¹Norbrook Laboratories Ltd, Newry, Co. Down, UK.

²IDDEX Laboratorios, Barcelona, Spain.

References

- Anon (1986) *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, HMSO, London.
- Barrett, E.J., Farlam, J. and Proudman, C.J. (2004) Field trial of the efficacy of a combination of ivermectin and praziquantel in horses infected with roundworms and tapeworms. *Vet. Rec.* **154**, 323-325.
- Francisco, I., Arias, M.S., Sánchez-Andrade, R., Paineira, A., Diaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P. and Paz-Silva, A. (2007) Preliminary detection of infection by gastrointestinal nematoda in horses from NW Spain. In: *Proceedings of the 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Gent.
- Laffont, C.M., Bousquet-Mélou, A., Bralet, D., Alvinerie, M., Fink-Gremmels, J. and Toutain, P.L. (2003) A pharmacokinetic model to document the actual disposition of topical ivermectin in cattle. *Vet. Res.* **34**, 445-460.
- Loehle, C. (2004) Applying landscape principles to fire hazard reduction. *Forest Ecol. Manage.* **198**, 261-267.
- Pereira, J.R. and Vianna, S.S. (2006) Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* **140**, 289-295.

Author contributions The initiation, conception and planning of this study were by I.F., J.A.S., F.J.C., R.F., E.M., M.A., J.L.S., R.S.-A. and A.P.-S., its execution by I.F., J.A.S., F.J.C., R.F., E.M., M.A., P. Mula, J.L.S., P. Morrondo and R.S.-A., writing by M.A., J.L.S., P. Morrondo, P.D.-B., R.S.-A. and A.P.-S., statistics by I.F., F.J.C., M.A., J.L.S., P. Morrondo, P.D.-B., R.S.-A. and A.P.-S., and pathology by I.F., J.A.S., F.J.C., R.F., E.M., M.A., J.L.S., P.D.-B., R.S.-A. and A.P.-S.



5. Resumen y Discusión

El silvopastoreo es una práctica agroforestal basada en un sistema integrado en la producción ganadera y forestal. Se trata pues de un régimen sostenible que presenta grandes ventajas como el mantenimiento de la biodiversidad, protección del medio (calidad del agua, reducción de erosión del suelo), control de vegetación inadecuada con la consiguiente disminución de la necesidad del empleo de herbicidas (Sharrow, 1999) o incluso mejora de la estética paisajística de algunas áreas (McAdam, 2004).

La finalidad de este sistema no es únicamente económica, aunando al beneficio de la producción de árboles de especies maderables los ingresos percibidos por la cría de animales en condiciones *ecológicas*. Con el abandono de tierras otrora cultivadas, cada año aumenta la superficie de terreno descuidado, que favorece el crecimiento de matorral y sotobosque, caracterizados por su elevada combustibilidad.

El mantenimiento de animales en fincas destinadas a la producción forestal facilita y asegura su alimentación. Este régimen de pastoreo continuo favorece la exposición a las formas infectivas de algunos patógenos, como por ejemplo ooquistes, cisticercoides, metacercarias o larvas, pese a que cabe considerar que su intensidad no sea elevada teniendo en cuenta que se trata de áreas muy extensas. El desarrollo de infecciones parasitarias en equinos en silvopastoreo supone una merma considerable en la productividad de este sistema agroforestal, puesto que disminuye la actividad de *desbroce*, los índices de fecundidad y los índices de conversión del alimento. Todo esto implica una reducción en los beneficios derivados de la producción animal.

Con frecuencia se describe que el control de los parasitismos del ganado ha de sostenerse en la acción sobre los hospedadores definitivos (quimioterapia) y sobre las fases de vida libre o de resistencia. Resulta innegable que estos dos procedimientos difícilmente puedan aplicarse en los sistemas silvopastorales. Cualquier acción encaminada a reducir la presencia de fases infectivas de parásitos (rotación, roturación, control biológico con hongos) parece abocada al fracaso por la extensión en la que se mueven los animales. De otro lado, la administración de antihelmínticos en las presentaciones convencionales (oral, subcutánea, intramuscular) a individuos con total libertad de movimiento tampoco constituye un procedimiento que se espera exitoso.

Todos estos condicionantes han llevado al diseño del presente trabajo orientado al análisis de la eficacia de la aplicación tópica (*pour on*) de ivermectina para la desparasitación de caballos en silvopastoreo.

Con objeto de establecer qué parásitos han de controlarse en caballos en silvopastoreo, se desarrolló un **PRIMER ENSAYO** en el que se recogieron muestras de heces de 483 equinos autóctonos Pura Raza Galega (PRG) mantenidos en este régimen, y de un grupo de 72 PRG en estabulación. El diagnóstico parasitológico se realizó con las técnicas copromicroscópicas de flotación, sedimentación, migración larvaria y coprocultivos, y los resultados se analizaron en función de la edad y sexo de los animales.

Sólo se observaron huevos de parásitos gastrointestinales nematodos y cestodos, mientras que no se encontraron formas de protozoos, trematodos ni parásitos broncopulmonares. Entre los gastrointestinales, se identificaron ascáridos (*Parascaris equorum*), estrongílicos y oxiúridos (*Oxyuris equi*). Mediante la realización de coprocultivos se reconocieron ejemplares de ciatostómidos (*Cyathostomum* y *Gyalocephalus* spp.) y de grandes estrongílicos (*Strongylus*).

En los caballos en silvopastoreo se obtuvieron las prevalencias más elevadas de parasitación, apreciándose que los equinos menores de 3 años tenían los mayores porcentajes de ascariosis, y los de más de 10 años la mayor prevalencia de estrongílicos. En relación con el sexo, las hembras resultaron más parasitadas. Estos resultados remarcan el riesgo más elevado de parasitación en los equinos en régimen de silvopastoreo, y que es necesario poner especial atención a los helmintos nematodos que se encuentran en el aparato digestivo. Las infecciones por ascáridos se han relacionado con alteraciones respiratorias y digestivas, debilidad, crecimiento disminuido, enteritis, e incluso obstrucción y peritonitis (ocasionalmente). Algunas estrongilosis cursan con lesiones en vasos sanguíneos, mucosa intestinal, pudiendo llegar a ser responsables de cólicos.

El manejo en silvopastoreo podría ofrecer una oportunidad muy interesante para diversificar las producciones agroganaderas y con ello estimular el desarrollo económico de zonas del rural, pero resulta necesario asegurar un aprovechamiento forestal y ganadero adecuados. El rendimiento de explotaciones forestales no se percibe hasta transcurrido un periodo de 15-20 años (en función de la especie vegetal), de modo que la cría de ganado podría suponer un incentivo más regular, que además presentaría el incentivo de haberse obtenido en condiciones bajo la etiqueta *ecológico*. Resulta obvio que el control parasitario redundaría en un mayor rendimiento de estas explotaciones.

Aunque la mayoría de los parasitismos gastrointestinales se diagnostican de forma rutinaria mediante técnicas coprológicas, no siempre son útiles puesto que algunos parásitos no eliminan formas de propagación a través de las heces. Este es el caso de las miasis (del griego *myia*, mosca), infestaciones de animales domésticos y salvajes, así como del hombre, provocadas por larvas de moscas de diferentes especies, que al menos durante una fase de su desarrollo se alimentan de tejidos vivos o muertos, o del alimento ingerido por el hospedador.

Las miasis de mayor importancia en équidos están ocasionadas por distintas especies de *Gasterophilus*, que permanecen adheridas a la pared o libres en la luz del tracto digestivo, desde la faringe hasta el recto. De las ocho especies existentes, *G. intestinalis* (mosca zumbadora común) es la más frecuente en la Península Ibérica y en diferentes países europeos.

En el **SEGUNDO EXPERIMENTO** se planteó la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral en caballos del Noroeste de España frente a antígenos de *G. intestinalis*, para determinar si los équidos en silvopastoreo padecían esta miasis; también se procedió a establecer la cronobiología de esta parasitación. Con periodicidad mensual, de enero de 2007 a 2008 se recogieron muestras de sangre de 2 grupos de equinos PRG. El primero estaba formado por adultos, y el segundo por potros nacidos en abril y sacrificados en octubre.

Para la elaboración de los antígenos de excreción/secreción, se recogieron larvas 2 de estómagos de caballos sacrificados en un matadero local, que se incubaron en medio de cultivo líquido. El sobrenadante recogido se dializó y se empleó en un ELISA. El experimento se completó con la toma de datos climáticos, la observación del pelaje del animal para la identificación de huevos del parásito, y de las heces de los caballos con el propósito de visualizar larvas 3.

Mediante la prueba inmunoenzimática se demostró la presencia de anticuerpos frente a *Gasterophilus* en los equinos PRG, lo que indica su exposición a este parásito. La cinética de la respuesta IgG descendió de enero a julio, obteniéndose un pequeño incremento de agosto a noviembre, momento en el cual los anticuerpos aumentaron de nuevo hasta enero.

El hallazgo de larvas 3 entre marzo y mayo, y de huevos en el pelo de los equinos en los meses de junio a septiembre, llevó a concluir que en áreas de clima oceánico como el Noroeste de la Península Ibérica, el periodo de oviposición de las moscas de *Gasterophilus* transcurre desde el final de la primavera. Las larvas 1 se encuentran en la cavidad bucal a partir del verano,

estación en la que las larvas 2 se dirigen al estómago e intestino, localizaciones en las que se convierten en larvas 3, que permanecen hasta el final del invierno. En este momento salen al exterior junto con las heces, pupan, y las moscas adultas emergen en primavera.

Aunque las moscas adultas causan molestias a los caballos, sobre todo por el zumbido que emiten, y porque las larvas 1 pueden producir inflamación local en la cavidad bucal, el efecto patógeno más importante se debe a las larvas 2 y 3, las primeras por las lesiones que causan en su migración hasta llegar al estómago y las L3, en casos de infestaciones masivas, pudiendo provocar distintos problemas en función de la especie y de la intensidad de parasitación.

La gasterofilosis se ha asociado con problemas de deglución, úlceras intestinales, obstrucciones o vólvulos intestinales, prolapso rectal, anemia, diarrea y otros trastornos digestivos. Su aparición suele relacionarse con la expoliación de nutrientes, inflamación en el punto de localización y acción tóxico-irritativa por liberación de productos de las larvas.

En casos de elevadas infestaciones se han producido úlceras y ruptura de la pared del estómago, con la consiguiente supuración y peritonitis. Estas situaciones suelen cursar con reflujo gastroesofágico, provocado frecuentemente por la presencia de un elevado número de larvas en la ampolla duodenal que impiden el correcto tránsito del alimento. Las larvas inmaduras de *G. nasalis* excavan trayectos entre los dientes pudiendo provocar necrosis de las encías. También se han publicado algunos trabajos que tratan el aspecto zoonótico de la gasterofilosis, basado en la aparición de cuadros de oftalmo-miasis en personas, fenómeno descrito también en perros.

Una vez demostrada la necesidad de desparasitar los caballos en silvopastoreo frente a nematodos ascáridos, estrongílicos, oxiúridos, y frente a gasterófilos, se consideraron diferentes posibilidades para su control, llegándose a la conclusión de que prácticamente sólo se podría actuar sobre los équidos.

La ivermectina es la lactona macrocíclica más utilizada para la desparasitación del ganado. En caballos, aunque al principio se administraba una dosis de 0'2 mg IVM kg p.v.⁻¹ por vía intramuscular, actualmente sólo existen formulaciones orales. Con esta dosificación se ha demostrado una elevada eficacia frente a nematodos intestinales (ciatostómidos, grandes estrongilos,

ascáridos, oxiúridos), así como contra parásitos pulmonares. Por todo ello, en el **TERCER ENSAYO** se evaluó la eficacia de ivermectina *pour on* en potros PRG infectados por nematodos parásitos. Se probaron 2 dosis de la lactona macrocíclica por vía tópica, la que se recomienda para el ganado vacuno ($0.5 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$, F-Nor0'5), y otra de $1 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ (F-Nor1). Se utilizó otro grupo tratado por vía oral ($0.2 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$, F-Eq0'2).

Cada 4 días se tomaron muestras de heces y de sangre de 48 potros autóctonos (Pura Raza Galega y Pura Raza Asturcón) de 7 meses de edad y 100-120 kg de peso. Se trata de equinos que se mantienen en silvopastoreo, pero para el desarrollo del presente estudio se mantuvieron estabulados durante 20 días.

La eficacia de los antiparasitarios se estimó mediante el cálculo de la reducción del número de huevos en heces (en inglés *Faecal Egg Count Reduction Test, FECRT*), y del porcentaje de equinos positivos a la coprología (Reducción de Caballos Positivos, RCP). El análisis se completó con la medición de diferentes parámetros séricos bioquímicos y enzimáticos.

Antes de la desparasitación de los potros, se observaron huevos de *Parascaris*, estromgílicos y *Oxyuris*; los coprocultivos mostraron la presencia de larvas 3 de *Cyathostomum* y *Gyalocephalus*. En todos los grupos la eliminación de huevos de ascáridos cesó a los 4 días post-tratamiento.

La administración de IVM por vía oral suprimió la eliminación de huevos de estromgílicos y oxiúridos a los 4 días post-tratamiento, mientras que esto ocurrió a los 8 días en los potros del F-Nor1. Se observaron huevos de estromgílicos durante todo el estudio en el grupo F-Nor0'5.

Los valores de nitrógeno ureico en sangre, creatinina, proteínas totales, albúmina, globulinas y lactato deshidrogenasa (LDH) disminuyeron de forma significativa después de la aplicación de IVM, aunque sólo se alcanzaron valores anormales para la LDH. Se estableció una correlación significativamente positiva entre la eliminación de huevos de ciatostómidos y los valores de LDH, lo que lleva a concluir que la medición de las variaciones de este enzima podría servir como índice del daño provocado por ciatostómidos a nivel intestinal.

El tiempo medio estimado en la desparasitación *pour on* resultó de 45 segundos para cada potro, por 5 minutos si se hacía oralmente. No se observaron efectos adversos (úlceras, alteraciones en la piel, depigmentación) tras el tratamiento por vía tópica. Los resultados obtenidos indican que con una aplicación *pour on* de 1 mg IVM kg p.v.⁻¹ se consiguen resultados similares al tratamiento por vía oral con 0'2 mg IVM kg p.v.⁻¹, y constituye un procedimiento muy útil para el control de infecciones parasitarias por nematodos intestinales que afectan a caballos en silvopastoreo.

Todos estos resultados conducen a la conclusión de que la formulación *pour on* de 1 mg IVM kg p.v.⁻¹ resulta fácil y segura de administrar, por lo que se recomienda su empleo para el control de parásitos intestinales en caballos en extensivo o en casos en que no es posible su correcta inmovilización.

Existe una opinión unánime de que los nematodos estrogílidos son los más frecuentes entre los equinos, por lo que han concitado la atención de gran parte de las investigaciones realizadas en estos animales. Para evaluar la eficacia de productos antiparasitarios, se ha intentado introducir criterios objetivos, como el cálculo de la reducción del número de huevos por gramo de heces (FECRT), estableciéndose que un porcentaje superior al 95% muestra que el parasiticida es eficaz.

Desde hace algunas décadas se han reseñado situaciones de eficacia inferior a la esperada tras la administración de diferentes fármacos, llegándose a considerar casos de *resistencia antihelmíntica* si los valores de FECRT son inferiores al 95%. Ante la dificultad de llegar a este diagnóstico en base sólo a este parámetro, se ha intentado introducir otras medidas, como el periodo de reaparición de huevos en las heces. De este modo, se ha relacionado la reducción de este periodo con la aparición de resistencia antihelmíntica.

En el **CUARTO ESTUDIO** se comprobó la duración del efecto de un tratamiento con IVM vía tópica en caballos. Se emplearon 12 equinos PRG, que se dividieron en 2 grupos, G-1 (8 yeguas tratados con 1 mg IVM kg p.v.⁻¹) y G-2 (4 yeguas que se mantuvieron sin tratar como testigos). Durante un periodo de 21 semanas se tomaron muestras de heces y sangre de forma individual. Las heces se procesaron con las técnicas copromicroscópicas de flotación, sedimentación y migración larvaria. También se monitorizaron los cambios en las series celulares sanguíneas.

El tratamiento con IVM *pour on* suprimió la eliminación de huevos de ascáridos y oxiúridos durante todo el estudio. No se observaron huevos de strongílidos entre las semanas 3 y 10 post-tratamiento, en coincidencia con investigaciones previas basadas en la desparasitación por vía oral.

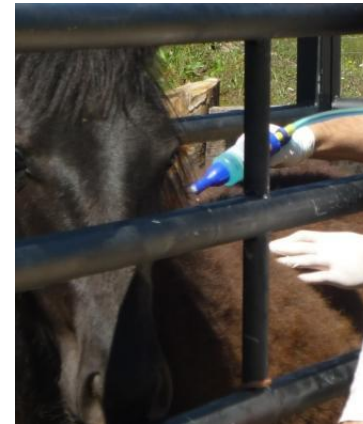
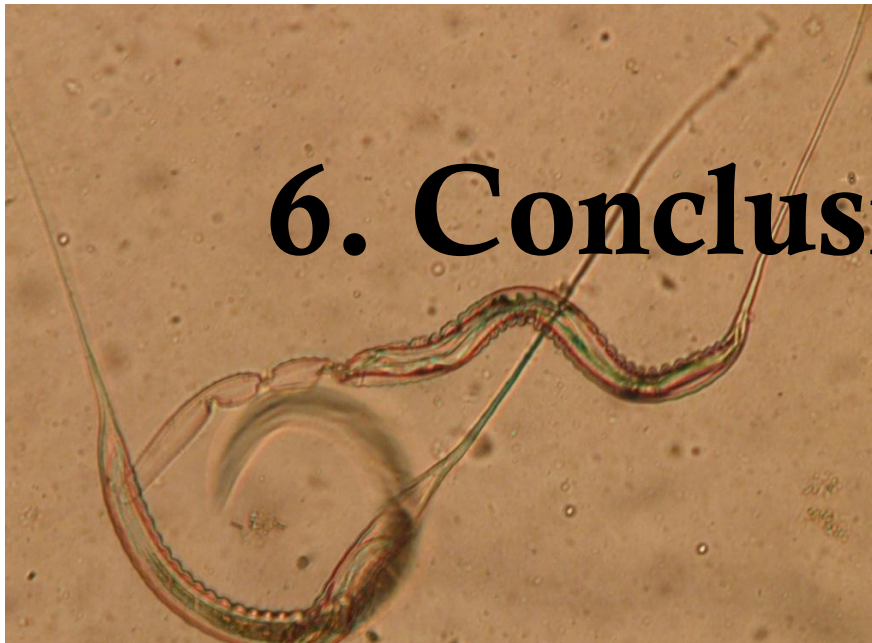
Los valores de la serie celular roja (eritrocitos, hemoglobina y volumen corpuscular medio) aumentaron de forma significativa en las yeguas tratadas, al tiempo que se observó una reducción significativa de las tasas de leucocitos.

Estos resultados ponen de manifiesto las ventajas de la formulación tópica de la ivermectina para la desparasitación de caballos en silvopastoreo, fundamentalmente basadas en la facilidad de aplicación, atenuación del estrés para los equinos, y reducción del riesgo de lesión en el personal encargado del tratamiento.

El efecto beneficioso de la quimioterapia queda demostrado por la recuperación de valores normales de eritrocitos, hemoglobina y volumen corpuscular medio; la disminución de los leucocitos refleja la eliminación de las formas parasitarias. Sería interesante añadir que la administración tópica del parasiticida se realiza en un periodo de tiempo pequeño, lo que también contribuye a disminuir el estrés no sólo individual, sino de todo el rebaño. Esto podría constituir un aspecto muy interesante en animales salvajes, dado que los grupos no resultarían alterados, y aumentarían sus posibilidades de supervivencia al ataque de animales depredadores.



6. Conclusiones



De los resultados obtenidos en el presente estudio hemos llegado a las siguientes **CONCLUSIONES**:

1^a.- El manejo de caballos en silvopastoreo incrementa el riesgo de infección por helmintos intestinales, en especial nematodos estrogílicos, lo que hace necesaria la aplicación de medidas adecuadas para el control de estas formas parasitarias.

2^a.- La prueba inmunoenzimática ELISA con antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus* spp. resulta de notable interés para el diagnóstico de infestaciones en equinos en silvopastoreo, al tiempo que constituye una herramienta muy valiosa para establecer la cronobiología de esta miasis.

3^a.- Con la administración tópica de una dosis de 1 mg de ivermectina kg p.v.⁻¹ se consiguen idéntica eficacia y duración frente a nematodos intestinales que con 0'2 mg de ivermectina kg p.v.⁻¹ por vía oral.

4^a.- La aplicación tópica de ivermectina resulta ideal para el control de nematodos intestinales de caballos en régimen de silvopastoreo por su facilidad de empleo, eficacia, coste y ausencia de reacciones adversas en la piel de los equinos.

5^a.- El daño que provoca la presencia de ciatostómidos en el intestino se puede estimar con el análisis de las variaciones de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

6^a.- La condición fisiológica de caballos en silvopastoreo parasitados por helmintos intestinales mejora con la ivermectina *pour on*, como se demuestra con la recuperación de los valores normales de los parámetros de la serie roja.

- AGNEESSENS, J., ENGELEN, S., DEBEVER, P., VERCRUYSSSE, J. (1998). *Gasterophilus intestinalis* infections in horses in Belgium. **Vet Parasitol.**, **77**: 199-204.
- ARIAS, M.S., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., PIÑEIRO, P., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., ROMASANTA, A., PAZ-SILVA, A. (2011). **Parasitic diseases in livestock under different farming practices: possibilities for their control**. En: Livestock: rearing, farming practices and diseases. M. Tariq Javed (Ed.). Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- BAGGOT, J.D. (1992). **Disposition and fate of drugs in the body**. En: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (6th Edition). H.R. Adams (Ed.). Iowa State University Press, USA, pp. 38-71.
- BAGGOT, J.D., MCKELLAR, Q.A. (1994). The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs – The role of pharmacokinetics. **J Vet Pharmacol Ther.**, **17**: 409-419.
- BAIRDEN, K., BROWN, S.R., MCGOLDRICK, J., PARKER, L.D., TALTY, P.J. (2001). Efficacy of moxidectin 2 per cent gel against naturally acquired strongyle infections in horses, with particular reference to larval cyathostomes. **Vet Rec.**, **148**: 138-141.
- BAIRDEN, K., DAVIES, H.S., GIBSON, N.R., HOOD, A.J., PARKER, L.D. (2006). Efficacy of moxidectin 2 per cent oral gel against cyathostomins, particularly third-stage inhibited larvae, in horses. **Vet Rec.**, **158**: 766-767.
- BALLENT, M., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOWITZ, J., LANUSSE, C. (2007). Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. **J Vet Pharmacol Ther.**, **30**: 242–248.
- BARRETT, E.J., BLAIR, C.W., FARLAM, J., PROUDMAN, C.J. (2005). Postdosing colic and diarrhoea in horses with serological evidence of tapeworm infection. **Vet Rec.**, **156**: 252-253.
- BARRIO CRESPO, M.P. (1977). **Nematodos gastroentéricos de los équidos de la provincia de León. Memoria de Licenciatura**. Facultad de Veterinaria de León, Universidad de León.
- BENTON, R.E., LYONS, E.T. (1994). Survey in central Kentucky for prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses at necropsy in 1992. **Vet Parasitol.**, **55**: 81-86.
- BERMÚDEZ, S.E., ESPINOSA, J.D., CIELO, A.B., CLAVEL, F., SUBÍA, J., BARRIOS, S., MEDIANERO, E. (2007). Incidence of myiasis in Panama during the eradication of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858, Diptera: Calliphoridae) (2002-2005). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **102**: 675-679.
- BLAGBURN, B.L., LINDASY, D.S. (2001). **Ectoparasiticides**. En: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (8th Edition). H.R. Adams (Ed.). Iowa State University Press, USA.

- BOERSEMA, J.H., BORGSTEEDE, F.H.M., EYSKER, M., SAEDT, I. (1995). The reappearance of strongyle eggs in faeces of horses treated with pyrantel embonate. **Vet Q.**, **17**: 18-20.
- BOERSEMA, J.H., EYSKER, M., MAAS, J., VAN DER AAR, W.M. (1996). Comparison of the reappearance of strongyle eggs on foals, yearlings and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. **Vet Q.**, **18**: 7-9.
- BOERSEMA, J.H., EYSKER, M., NAS, J.W. (2002). Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. **Vet Rec.**, **150**: 279-281.
- BOERSEMA, J.H., EYSKER, M., VAN DER AAR, W.M. (1998). The reappearance of strongyle eggs in the faeces of horses after treatment with moxidectin. **Vet Q.**, **20**: 15-17.
- BOHÓRQUEZ GONZÁLEZ, A., FERNÁNDEZ PATO, N., MARTÍN HERNÁNDEZ, R., LUZÓN PEÑA, M., MEANA MÁÑEZ, A. (2011). Nuevos cebadores para el diagnóstico molecular de cestodosis equinas. **XII Congreso Ibérico de Parasitología**, Zaragoza, 5-8 julio.
- BONNEAU, S., MAYNARD, L., TOMCZUK, K., KOK, D., EUN, H.M. (2009). Anthelmintic efficacies of a tablet formula of ivermectin-praziquantel on horses experimentally infected with three *Strongylus* species. **Parasitol Res.**, **105**: 817-823.
- BORGSTEEDE, F.H., BOERSMA, J.H., GAASENBEEK, C.P., VAN DER BURG, W.P. (1993). The reappearance of eggs in faeces of horses after treatment with ivermectin. **Vet Q.**, **15**: 24-26.
- BOWLES, J., BLAIR, D., McMANUS, D.P. (1995). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. **Parasitology**, **110**: 317-328.
- BRADSHAW, R.H.W., HANNON, G.E., LISTER, A.M., 2003. A long-term perspective on ungulate-vegetation interactions. **Forest Ecol Manag.**, **181**: 267-280.
- BUCKNELL, D.G., GASSER, R.B., BEVERIDGE, I. (1995). The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. **Int J Parasitol.**, **25**: 711-724.
- BURTON, A.J., NYDAM, D.V., DEAREN, T.K., MITCHELL, K., BOWMAN, D.D., XIAO, L. (2010). The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Vet Parasitol.**, **174**: 139-144.
- CAMPBELL, W.C. (1989). Ivermectin and Abamectin. Springer, New York, USA.
- CHANDLER, K.J., LOVE, S. (2002). Patterns of equine faecal egg counts following spring dosing with either fenbendazole or moxidectin. **Vet Rec.**, **151**: 269-270.

- CHAPMAN, M.R., FRENCH, D.D., KLEI, T.R. (2001). Seasonal transmission of gastrointestinal parasites of equids in Southern Louisiana. **J Parasitol.**, **87**: 1371-1378.
- CHAPMAN, M.R., FRENCH, D.D., MONAHAN, C.M., KLEI, T.R. (1996). Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. **Vet Parasitol.**, **66**: 205-212.
- CHAPMAN, M.R., FRENCH, D.D., TAYLOR, H.W., KLEI, T.R. (2002). One season of pasture exposure fails to induce a protective resistance to cyathostomes but increases numbers of hypobiotic third-stage larvae. **J Parasitol.**, **88**: 678-683.
- CIRAK, V.Y.; GÜLEĞEN, E.; BAUER, C. (2004). Benzimidazole resistance in cyathostomin populations on horse farms in western Anatolia, Turkey. **Parasitol Res.**, **93**: 392-395.
- CLEALE, R.M., EDMONDS, J.D., PAUL, A.J., REINEMEYER, C.R., CHAPMAN, M.R., CLEM, R., MECCOLI, R.A., TOLLIVER, S.C., AMODIE, D.M. (2006). A multicenter evaluation of the effectiveness of Equest Gel (2% moxidectin) against parasites infecting equids. **Vet Parasitol.**, **137**: 119-129.
- COLES, G.C. (2002). Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. **Vet Rec.**, **151**: 165-169.
- COLES, G., RHODES, A. (2005). Control of nematode infections in horses. **Vet Rec.**, **157**: 123.
- COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER, P.J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet Parasitol.**, **44**: 35-44.
- COLES, G.C., JACKSON, F., POMROY, W.E., PRICHARD, R.K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SILVESTRE, A., TAYLOR, M.A. VERCRUYSSSE, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet Parasitol.**, **136**: 167-185.
- COLLOBERT-LAUGIER, C., HOSTE, H., SEVIN, C., DORCHIES, P. (2002). Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. **Vet Parasitol.**, **110**: 77-83.
- COMER, K.C., HILLYER, M.H., COLES, G.C. (2006). Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. **Vet Rec.**, **158**: 596-598.
- COMISIÓN MUNDIAL SOBRE EL MEDIO Y EL DESARROLLO. DECLARACIÓN DE TOKIO (1987).
http://www.cma.gva.es/comunes_asp/documentos/legislacion/cas/006000225_1.htm
- COOK, D.F., DADOUR, I.R., ALI, D.N. (1996). Effect of diet on the excretion profile of ivermectin in cattle faeces. **Int J Parasitol.**, **26**: 291-295.
- CORDERO, M., ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1999). Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill, Madrid (España).

- CORNING, S. (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasit. Vectors**, **2 Suppl 2**: S1.
- CORTIÑAS, F.J. (2009). **Estudio epidemiológico transversal de la presencia de anticuerpos IgG frente a antígenos de *Gasterophilus* en caballos de Galicia. Trabajo de Investigación Tutelado.** Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2010) Chronobiology of *Gasterophilus* infestations in silvopasturing horses from NW Spain. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, **69**: 66-71.
- CRAIG, T., SCRRUTCHFIELD, W., THOMPSON, J. (2003). Comparison of anthelmintic activity of pyrantel, praziquantel, and nitazoxanide against *Anaplocephala perfoliata* in horses. **J Equine Vet Sci.**, **23**: 68.
- CRAVEN, J., BJØRN, H., BARNES, E. H., HENRIKSEN, S. A., NANSEN, P. (1999). A comparison of *in vitro* tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Vet Parasitol.**, **85**: 49-59.
- CRINGOLI, G. (2006). FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. **Parassitologia**, **48**: 381-4.
- CUTOLO, A.A., SANTOS, A.T., ALLEGRETTI, S.M. (2011). Field study on the efficacy of an oral 2% ivermectin formulation in horses. **Rev Bras Parasitol Vet.**, **20**: 171-175.
- DA SILVA ANJOS, D.H., DE LURDES, A., RODRIGUES, M. (2006). Diversity of the infracommunities of strongylid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. **Vet Parasitol.**, **136**: 251-257.
- DASH, K., HALL, K., BARGER, I.A. (1988). The role of arithmetic and geometric worm egg counts in faecal egg count reduction test and in monitoring strategic drenching programs in sheep. **Aust Vet J.**, **65**: 66-68.
- DAVIES, J.A., SCHWALBACH, L.M. (2000). A study to evaluate the field efficacy of ivermectin, fenbendazole and pyrantel pamoate, with preliminary observations on the efficacy of doramectin, as anthelmintics in horses. **J S Afr Vet Assoc.**, **71**: 144-147.
- DAWSON, K. (2003). A non-lethal method for assessment of efficacy of antiparasitics against parasites in horses such as *Anaplocephala perfoliata* and *Gasterophilus intestinalis*. **Vet Parasitol.**, **115**: 67-70.
- DIARIO OFICIAL DE GALICIA (2008). CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL: Orde do 4 de decembro de 2008 pola que se establecen as bases reguladoras das axudas para o fomento e mellora do cabalo de pura raza galega e se convocan para o ano 2009.

- DOBSON, R.J., BESIER, R.B., BARNES, E.H., LOVE, S.C.J., VISARD, A., BELL, L.F., LE JAMBRE, L.F. (2001). Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance. **Austr Vet J.**, **79**: 756–761.
- DÖPFER, D., KERSSSENS, C.M., MEIJER, Y.G., BOERSEMA, J.H., EYSKER, M. (2004). Shedding consistency of strongyle-type eggs in Dutch boarding horses. **Vet Parasitol.**, **124**: 249-58.
- DORNBUSCH, P.T., MICHELOTTO, P.V., SNTARÉM, V.A., DE CARLI, L.M., CAMARGO, C.E., BIAVA, J.S. (2006). Eficácia anti-helmíntica da ivermectina “pour on” comparada com a formulação oral em gel nos equinos. **Rev Acad Curitiba**, **4**: 21-24.
- DOWDALL, S.M., PROUDMAN, C.J., KLEI, T.R., MAIR, T., MATTHEWS, J.B. (2004). Characterisation of IgG(T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally- or experimentally-infected with cyathostomins. **Int. J. Parasitol.**, **34**: 101-108.
- DOWDALL, S.M., PROUDMAN, C.J., LOVE, S., KLEI, T.R., MATTHEWS, J.B. (2003). Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horses. **Res Vet Sci.**, **75**: 223-229.
- DOWDALL, S.M.J., MATTHEWS, J.B., MAIR, T., MURPHY, D., LOVE, S., PROUDMAN, C.J. (2002). Antigen-specific IgG (T) responses in natural and experimental cyathostominae infection in horses. **Vet Parasitol.**, **106**: 225-242.
- DRUDGE, J.H., LYONS, E.T. (1977). Methods in the evaluation of antiparasitic drugs in the horse. **Am J Vet Res.**, **38**: 1581-1586.
- DRUDGE, J.H., SZANTO, J., WYANT, Z.N., ELAM, G.W. (1963). Critical tests of thiabendzole as an anthelmintic in the horse. **Am J Vet Res.**, **24**: 1217-1222.
- DUDENEY, A., CAMPBELL, C., COLES, G. (2008). Macrocyclic lactone resistance in cyathostomins. **Vet Rec.**, **163**: 163-164.
- DUMÉNIGO, B.E., ESPINO, A.M., FINLAY, C.M., MEZO, M. (1999). Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol.**, **86**: 23-31.
- EDWARD, C.L., HOFFMANN, A.A. (2008). Ivermectin resistance in a horse in Australia. **Vet Rec.**, **162**: 56-57.
- ELSENER, J., VILLENEUVE, A. (2009). Comparative long-term efficacy of ivermectin and moxidectin over winter in Canadian horses treated at removal from pastures for winter housing. **Can Vet J.**, **50**: 486-490.
- ELSENER, J., VILLENEUVE, A. (2011). Does examination of fecal samples 24 hours after cestocide treatment increase the sensitivity of *Anoplocephala* spp. detection in naturally infected horses? **Can Vet J.**, **52**: 158-161.

- EPE, C., COATI, N., SCHNIEDER, T. (2004). Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.**, **111**: 243-247.
- ERDMAN MM, CREEKMORE LH, FOX PE, PELZEL AM, PORTER-SPALDING BA, AALSBURG AM, COX LK, MORNINGSTAR-SHAW BR, CROM RL. (2010). Diagnostic and epidemiologic analysis of the 2008-2010 investigation of a multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. **Prev Vet Med.**, **101**: 219-228.
- FIKRU, R., RETA, D., TESHALE, S., BIZUNESH, M. (2005). Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western highlands of Oromia, Ethiopia. **Bull An Health Prod Afr.**, **53**: 161-166.
- FOGARTY, U., DEL PIERO, F., PURNELL, RE., MOSURSKI, K.R. (1994). Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at an Irish abattoir. **Vet Rec.**, **134**: 515-518.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, I. (2007). **Análisis de riesgo de infección parasitaria en el caballo gallego. Trabajo de Investigación Tutelado.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, I. (2010). **Epidemiología de los principales parasitismos del caballo en Galicia. Tesis Doctoral.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, R. (2008). **Parásitos helmintos que afectan al caballo gallego. Memoria de Licenciatura.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, R. (2009). **Desarrollo de un ELISA con antígenos de excreción/secreción para la detección de strongilosis equina. Trabajo de Investigación Tutelado.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., SÁNCHEZ, J.A., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009a). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. **Vet Parasitol.**, **164**: 357-362.
- FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., DACAL, V., SUÁREZ, J.L., URIARTE, J., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009c). Intrinsic

- Factors Influencing the Infection by Helminth Parasites in Horses under an Oceanic Climate Area (NWSpain). **J Parasitol Res. doi:10.1155/2009/616173.**
- FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., MULA, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009b). Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. **Equine Vet J.**, **41**: 713-715.
- FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., MORRONDO, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2011a). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. **J Equine Vet Sci.**, **31**: 530-535.
- FRANCISCO, R., PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., MIGUÉLEZ, S., SUÁREZ, J., CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2011b). Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. **J Equine Vet Sci. doi:10.1016/j.jevs.2011.09.074.**
- GASPAR, P., ESCRIBANO, M., MESÍAS, F.J., RODRÍGUEZ DE LEDESMA, A., PULIDO, F. (2008). Sheep farms in the Spanish rangelands (dehesas): Typologies according to livestock management and economic indicators. **Small Ruminant Res.**, **74**: 52-63.
- GASSER, R.B., HUNG, G.C., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I. (2004). Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. **Mol Cell Probes**, **18**: 3-16.
- GAYRARD, V., ALVINERIE, M., TOUTAIN, P.L. (1999). Comparison of pharmacokinetic profiles of doramectin and ivermectin pour-on formulations in cattle. **Vet Parasitol.**, **81**: 47-55.
- GEURDEN, T., DEPRez, P., VERCRUYSSSE, J. (2003). Efficacy of ivermectin against *Sarcoptes scabid var suis* in pigs. **Vet Rec.**, **153**: 272-273.
- GILES, C.J., UQUHART, H.A., LONGSTAFFE, J.A. (1985). Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 51 clinical cases. **Equine Vet J.**, **17**: 196-201.
- GOKBULUT, C., CIRAK, V.Y., SENLIK, B., AKSIT, D., DURMAZ, M., MCKELLAR, Q.A. (2010). Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. **Vet Parasitol.**, **170**: 120-126.

- GOKBULUT, C., KARADEMIR, U., BOYACIOGLU, M., 2007. Comparison of plasma pharmacokinetic profile of ivermectin following administration of subcutaneous injection (Baymec) and oral tablet (Efektin) in goats. **J Vet Pharmacol Ther.**, **30**: 489-491.
- GOKBULUT, C., KARADEMIR, U., BOYACIOGLU, M., McKELLAR, Q.A. (2008). The effect of sesame and sunflower oils on the plasma disposition of ivermectin in goats. **J Vet Pharmacol Ther.**, **31**: 472-478.
- GÖKÇEN, A.; SEVGILI, M.; ALTAŞ, M.G.; CAMKERTEN, I. (2008). Presence of *Gasterophilus* species in Arabian horses in Sanliurfa region. **Türkiye Parazit Derg.**, **32**: 337-339.
- GÜIRIS, A.D., ROJAS, H.N., BEROVIDES, A.V., SOSA, P.J., PÉREZ, E.M., CRUZ, A.E., CHÁVEZ, H.C., MOGUEL, A.J., JIMÉNEZ-COELLO, M., ORTEGA-PACHECO, A. (2010). Biodiversity and distribution of helminths and protozoa in naturally infected horses from the biosphere reserve La Sierra Madre de Chiapas", México. **Vet Parasitol.**, **170**: 268-277.
- HEARN, F.P., PEREGRINE, A.S. (2003). Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. **J Am Vet Assoc.**, **223**: 482-485.
- HENNESSY, D.R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. **Vet Parasitol.**, **72**: 367-382.
- HERD, R. (1995). Endectocidal drugs: ecological risks and counter-measures. **Int J Parasitol.**, **25**: 875-885.
- HODGKINSON, J. E., LOVE, S., LICHTENFELS, J. R., PALFREMAN, S., RAMSEY, Y. H., MATTHEWS, J. B. (2001). Evaluation of the specificity of five oligoprobes for identification of cyathostomin species from horses. **Int J Parasitol.**, **31**: 197-204.
- HODGKINSON, J.E. (2006). Molecular diagnosis and equine parasitology. **Vet Parasitol.**, **136**: 109-116.
- HODGKINSON, J.E.; FREEMAN, K.L.; LICHTENFELS, J.R.; PALFREMAN, S.; MATTHEWS, J.B. (2005). Identification of strongyle eggs from antihelmintic treated horses using a PCR-ELISA based on intergenic DNA sequences. **Parasitol Res.**, **95**: 287-292.
- HÖGLUND J, LJUNGSTRÖM BL, NILSSON O, UGGLA A. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. **Vet Parasitol.**, **59**: 97-106.
- HOLTER, P., HENDRIKSEN, N.B. (1988). Respiratory and bulk export of organic matter from cattle dung pats: a field study. **Holarctic Ecology**, **11**: 81-86.
- HUNG, G.C., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I., GASSER, R.B. (2000). Molecular systematic framework for equine strongyles based on DNA sequence data. **Int J Parasitol.**, **30**: 95-103.

- HUSAK, A.L., GRADO, S.C. (2002). Monetary benefits in a southern silvopastoral system. **Southern J Appl Forestry**, **26**: 159-164.
- IGLESIAS, L.E., SAUMELL, C.A., FUSÉ, L.A., LIFSCHITZ, A.L., RODRIGUEZ, E.M., STEFFAN, P.E., FIEL, C.A. (2005). Impacto ambiental de la ivermectina eliminada por bovinos tratados en otoño, sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal en pasturas (Tandil, Argentina). **RIA**, **34**: 83-103.
- IHLER, C.F., ROOTWELT, V., HEYERAAS, A., DOLVIK, N.J. (1995). The prevalence and epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in Norway. **Vet Res Commun.**, **19**: 487-494.
- IONITA, M., HOWE, D.K., LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., KAPLAN, R.M., MITREA, I.L., YEARGAN, M. (2010). Use of a reverse line blot assay to survey small strongyle (Strongylida: Cyathostominae) populations in horses before and after treatment with ivermectin. **Vet Parasitol.**, **168**: 332-337.
- JACKSON, F., COOP, R.L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, **120**: S95-S107.
- JACOBS, D.E., HUTCHINSON, M.J., PARKER, L., GIBBONS, L.M. (1995). Equine cyathostome infection – suppression of faecal egg output with moxidectin. **Vet Rec.**, **137**: 545.
- KANIA, S.A., REINEMEYER, C.R. (2005). *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. **Vet Parasitol.**, **127**: 115-119.
- KAPLAN, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Vet Res.**, **33**: 491-507.
- KAPLAN, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends Parasitol.**, **20**: 477-481.
- KARA, M. (1996). **Antibody responses to equine cyathostome infections. A Thesis.** Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, pp 1-51.
- KAYE, J.N., LOVE, S., LICHTENFELS, J.R., McKEAND, J.B. (1998). Comparative sequence analysis of the intergenic spacer region of cyathostome species. **Int J Parasitol.**, **28**: 831-836.
- KHALIFA, O.A. (2006). Getting the best out of ivermectin: Effect of administration route on efficacy. <http://dutchfarmint.com/Ivermectin.pdf>
- KHARCHENKO, V., KUZMINA, T., TRAWFORD, A., GETACHEW, M., FESEHA, G. (2009). Morphology and diagnosis of some fourth-stage larvae of cyathostomines (Nematoda: Strongyloidea) in donkeys *Equus asinus* L. from Ethiopia. **Syst Parasitol.**, **72**: 1-13.

- KJAER, L.N., LUNGHOLT, M.M., NIELSEN, M.K., OLSEN, S.N., MADDOX-HYTTEL, C. (2007). Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. **Equine Vet J.**, **39**: 529-533.
- KLEI, T.R. (1996). Workshop summary: equine parasitology. **Vet Parasitol.**, **64**: 163-166.
- KLEI, T.R. (2000). Equine immunity to parasites. **Vet Clin North Am Eq Pract.**, **16**: 69-78.
- KLEI, T.R., REHBEIN, S., VISSER, M., LANGHOLFF, W.K., CHAPMAN, M.R., FRENCH, D.D., HANSON, P. (2001). Re-evaluation of ivermectin efficacy against equine gastrointestinal parasites. **Vet Parasitol.**, **98**: 315-320.
- KLEI, T.R.; CHAPMAN, M.R. (1999). Immunity in equine cyathostome infections. **Vet Parasitol.**, **85**: 123-133.
- KORNAŚ, S., CABARET, J., SKALSKA, M., NOWOSAD, B. (2010). Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. **Vet Parasitol.**, **174**: 285-91.
- KORNAŚ, S., SKALSKA, M., NOWOSAD, B. (2006). Occurrence of roundworm (*Parascaris equorum*) in horses from small farms based on necropsy. **Wiad Parazytol.**, **52**: 323-326.
- KORNAŚ, S., SKALSKA, M., NOWOSAD, B., GAWOR, J. (2007). The communities of cyathostomes (Cyathostominae) in year-old and two-year-old Pure Blood Arabian mares. **Wiad Parazytol.**, **53**: 325-329.
- KUZMINA, T.A., KHARCHENKO, V.A., STAROVIR, A.I., DVOJNOS, G.M. (2005). Analysis of the strongylid nematodes (Nematoda: Strongylidae) community after deworming of brood horses in Ukraine. **Vet Parasitol.**, **131**: 283-290.
- KUZMINA, T.A., KHARCHENKO, V.O. (2008). Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. **Vet Parasitol.**, **154**: 277-288.
- KUZMINA, T.A., KUZMIN, Y.I., KHARCHENKO, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. **Vet Parasitol.**, **141**: 264-272.
- KUZMINA, T.A., TOLLIVER, S.C., LYONS, E.T. (2011). Three recently recognized species of cyathostomes (Nematoda: Strongylidae) in equids in Kentucky. **Parasitol Res.**, **108**: 1179-1184.
- KWA, M.S., VEENSTRA, J.G., VAN DIJK, M., ROOS, M.H. (1995). Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **J Mol Biol.**, **246**: 500-510.
- LAFFONT, C.M., ALVINERIE, M., BOUSQUET-MELOU, A., TOUTAIN, P.L. (2001). Licking behaviour and environmental contamination arising from pour on ivermectin for cattle. **Int J Parasitol.**, **31**: 1687-1692.
- LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., ÁLVAREZ, L., SÁNCHEZ, S., SUTRA, J.F., GALTIER, P. ALVINERIE, M. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **J Vet Pharmacol Ther.**, **20**: 91-99.

- LANUSSE, C.E., PRICHARD, R.K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Vet Parasitol.**, **49**: 123-158.
- LARSEN, M.L., RITZ, C., PETERSEN, S.L., NIELSEN, M.K. (2011). Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. **Vet J.**, **188**: 44-47.
- LECUREUR, V., COURTOIS, A., PAYEN, L., VERHNET, L., GUILLOUZO, A., FARDEL, O. (2000). Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. **Toxicology**, **153**: 203-209.
- LICHTENFELS, J.R. (2008). Identification keys to strongylid nematode parasites of equids. Preface. **Vet Parasitol.**, **156**: 1-3.
- LICHTENFELS, J.R., KHARCHENKO, V.A., DVOJNOS, G.M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). **Vet Parasitol.**, **156**: 4-161.
- LIFSCHITZ, A., BALLENT, M., VIRKEL, G., SALLOWITZ, J., LANUSSE, C. (2006). Modulation of P-glycoprotein intestinal activity enhances ivermectin absorption in sheep. **J Vet Pharmacol Ther.**, **29**: 249-250.
- LIFSCHITZ, A., SALLOVITZ, J., IMPERIALE, F., PIS, A., LORDA, J.J., LANUSSE, C. (2004). Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. **Vet Parasitol.**, **119**: 247-257.
- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., IMPERIALE, F., SUTRA, J.F., GALTIER, P., LANUSSE, C.E., ALVINERIE, M. (1999). Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition kinetics. **J Vet Pharmacol Ther.**, **22**: 266-273.
- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOWITZ, J., SUTRA, J.F., GALTIER, P., ALVINERIE, M., LANUSSE, C. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. **Vet Parasitol.**, **87**: 327-338.
- LINDGREN, K., LJUNGVALL, O., NILSSON, O., LJUNGSTRÖM, B.L., LINDAHL, C., HÖGLUND, J. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. **Vet Parasitol.**, **151**: 337-343.
- LITTLE, D., FLOWERS, J.R., HAMMERBERG, B.H., GARDNER, S.Y. (2003). Management of drug resistant cyathostomiasis on a breeding farm in central North Carolina. **Equine Vet J.**, **35**: 246-251.
- LO, P.K.A., FINK, D.W., WILLIAMS, J.B., BLODINGER, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin – effects of formulation. **Vet Res Commun.**, **9**: 251-268.
- LÓPEZ-DÍAZ, M.L., RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A., MOSQUERA-LOSADA, M.R. (2009). Influence of pasture botanical composition and fertilization treatments on tree growth. **Forest Ecol Manag.**, **257**: 1363-1372.
- LOVE, S., McKEAND, J.B. (1997). Cyathostomiasis: practical issues of treatment and control. **Equine Vet Educ.**, **9**: 253-256.

- LOVE, S., MURPHY, D., MELLOR D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infections. **Vet Parasitol.**, **85**: 115-122.
- LYONS, E.T., DRUDGE, J.H., TOLLIVER, S.C., SWERCZEK, T.W. (1986). Pyrantel pamoate: evaluating its activity against tapeworms. **Vet Med.**, **81**: 280-285.
- LYONS, E.T., DRUDGE, J.H., TOLLIVER, S.C., SWERCZEK, T.W., COLLINS, S.S. (1989). Determination of the efficacy of pyrantel pamoate at the therapeutic dose rate against the tapeworm *Anoplocephala perfoliata* in equids using a modification of the critical test method. **Vet Parasitol.**, **31**: 13-18.
- LYONS, E.T., TOLLIVER S.C., RATHGEBER, R.A., COLINS, S.S. (2006). Parasite field study in central Kentucky on thoroughbred foals (born in 2004) treated with pyrantel tartrate daily and other parasiticides periodically. **Parasitol Res.**, **100**: 473-478.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., COLLINS, S.S. (2006). Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. **Parasitol Res.**, **99**: 114-118.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., COLLINS, S.S. (2007). Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. **Parasitol Res.**, **101**: 689-701.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., COLLINS, S.S., DRUDGE, J.H. (2001). Transmission of endoparasites in horse foals born on the same pasture on a farm in central Kentucky (1996-1999). **Vet Parasitol.**, **97**: 113-121.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., IONITA, M., COLLINS, S.S. (2008). Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxbendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. **Parasitol Res.**, **103**: 287-291.
- MacLACHLAN, N.J., BALASURIYA, U.B. (2006). Equine viral arteritis. **Adv Exp Med Biol.**, **581**: 429-433.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M. (2001). **Epidemiologia e controlo da strongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal. Tese de Dissertação de Doutoramento.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 445 + xxii pp.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., AFONSO-ROQUE, M.M., FAZENDEIRO, M.I. (2003). Morfotipos de L3 do género *Cyathostomum sensu lato* (Nematoda: Strongyloidea) – Aplicações no estudo do parasitismo por ciatostomíneos em equinos. **Acta Parasitol. Port.**, pp. 2.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., BERNARDO, F.A., PAZ-SILVA, A. (2012). The role of fungi in the control of animal parasites – Classification, mode of action and practical applications. En: M.S. Arias Vázquez, A. Paz-Silva A (Eds.), *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. New York, Nova Science Publishers (*en prensa*)

- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., GOMES, L., CERNEA, M., CERNEA, C., SANTOS, C.A., BERNARDES, N., ROSÁRIO, M.A., SOARES, M. J., FAZENDEIRO, I. (2007). Parasitismo gastrintestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. **Rev. Port. Ciências Vet.**, **102**: 225-231.
- MADEIRA DE CARVALHO, LM, AFONSO-ROQUE, MM, CARVALHO-VARELA, M (1999). Seasonal pattern of a population of horse strongyles in Portugal. **17th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**. 15th-19th August, Copenhagen, Denmark.
- MAFF (1987). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Ministry of. Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin N°18. Ed. HMSO, London.
- MAINGI, N., BJØRN, H., DANGOLLA, A. (1998). The relationship between faecal egg count reduction and the lethal dose 50% in the egg hatch assay and larval development assay. **Vet Parasitol.**, **77**: 133-145.
- MAIR, T.S., SUTTON, D.G., LOVE, S. (2000). Caecocaecal and caecocolic intussusceptions associated with larval cyathostomosis in four young horses. **Equine Vet J Suppl.**, **32**: 77-80.
- MAIR, T.S., SUTTON, D.G., LOVE, S. (2000). Caecocaecal and caecocolic intussusceptions associated with larval cyathostomosis in four young horses. **Equine Vet J. Suppl.**, **32**: 77-80.
- MARTIN-DOWNUM, K., YAZWINSKI, T., TUCKER, C., FINCHER, M., RALPH, J., HAMILTON, J. (2001). Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. **Vet Parasitol.**, **101**: 75-79.
- MARTINEZ, M., MODRIC, S., SHARKEY, M., TROUTMAN, L., WALKER, L., MEALEY, K. (2008). The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **J Vet Pharmacol Ther.**, **32**: 285–300.
- MATTHEE, S. (2003). Anthelmintic treatment in horses: the extra-label use of products and the danger of under-dosing. **J S Afr Vet Assoc.**, **74**: 53-56.
- MATTHEE, S., KRECEK, R.C., McGEOCH, M.A. (2004). A comparison of the intestinal helminth communities of Equidae in Southern Africa. **J Parasitol.**, **90**: 1263-1273.
- MATTHEWS, A.G., MORRIS, J.R. (1995). Cyathostomiasis in horses. **Vet Rec.**, **136**: 52.
- MAVROGIANNI, V.S., FTHENAKIS, G.C., BURRIEL, A.R., GOULETSOU, P., PAPAIOANNOU, N., TAITZOGLU, I.A. (2004). Experimentally induced teat stenosis in dairy ewes: clinical, pathological and ultrasonographic features. **J Comp Pathol.**, **130**: 70-74.
- McADAM, J.H. (2004). **Silvopastoral systems in North-West Europe**. En: Silvopastoralism and Sustainable Land Management. M.R. Mosquera-Losada, J. Mcadam, A. Rigueiro-Rodríguez (Eds.). CAB Internacional, 429pp.

- McKELLAR, Q.A. (1997). Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. **Vet. Parasitol.**, **72**: 413-435.
- McKELLAR, Q.A., BENCHAOUI, H.A. (1996). Avermectins and milbemycins. **J Vet Pharmacol Therap.**, **19**: 331-351.
- McWILLIAM, H.E., NISBET, A.J., DOWDALL, S.M., HODGKINSON, J.E., MATTHEWS, J.B. (2010). Identification and characterisation of an immunodiagnostic marker for cyathostomin developing stage larvae. **Int J Parasitol.**, **40**: 265-275.
- MEANA, A, MATEOS, A, PATO, NF, MARTÍN, R. (2003). Todo sobre los responsables de las cestodosis equinas. **Monografías Equinus**, **3**: 53-64.
- MEANA, A., LUZÓN, M., CORCHERO, J., GÓMEZ-BAUTISTA, M. (1998). Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. **Vet Parasitol.**, **74**: 79-83.
- MEANA, A., PATO, N., MARTÍN, R., MATEOS, A., PÉREZ GARCÍA, J., LUZÓN, M. (2005). Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: Infection pattern and population dynamics. **Vet Parasitol.**, **130**: 233-240.
- MERCIER, P., CHICK, B., ALVES-BRANCO, F., WHITE, C.R. (2001). Comparative efficacy, persistent effect, and treatment intervals of anthelmintic pastes in naturally infected horses. **Vet Parasitol.**, **99**: 29-39.
- MEYER, W., GODYNICKI, S., TSUKISE, A. (2008). Lectin histochemistry of the endothelium of blood vessels in the mammalian integument, with remarks on the endothelial glycocalyx and blood vessel system nomenclature. **Ann Anat.**, **190**: 264-276.
- MEYER, W., NEURAND, K. (1987). A comparative scanning electron microscopic view of the integument of domestic mammals. **Scanning Microsc.**, **1**: 169-180.
- MFITILODZE, M.W., HUTCHINSON, G.W. (1990). Prevalence and abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongyloidea) in tropical Australia. **J Parasitol.**, **76**: 487-494.
- MFITILODZE, M.W.; HUTCHINSON, G.W. (1989). Prevalence and intensity of non-strongyle intestinal parasites of horses in northern Queensland. **Aust Vet J.**, **66**: 23-26.
- MILLER, C.M., WAGHORN, T.S., LEATHWICK, D.M., GILMOUR, M.L. (2006). How repeatable is a faecal egg count reduction test? **N Z Vet J.**, **54**: 323-328.
- MIRCK, M.H. (1985) **Chemotherapy of gastrointestinal nematodiasis in equines**. En: Chemotherapy of Gastrointestinal Helminths. H.V. Bossche, D. Thienpont, P.G. Janssens (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 443-462.
- MOLENTO, M.B., ANTUNES, J., BENTES, R.N., COLES, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Vet Rec.**, **162**: 384-385.

- MONTEIRO-RIVIERE, A., BAYNES, R.E., RIVIERE, J.E. (2008). **Animal skin morphology and dermal absorption**. En: Dermal Absorption and Toxicity Assessment (2nd Edition). M.S. Roberts, K.A. Walters (Eds.). Informa Healthcare USA, Inc, New York, pp. 17-36.
- MORGAN, E.R., HETZEL, N., POVAH, C., COLES, G.C. (2005). Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. **Vet Rec.**, **156**: 597-600.
- MOSQUERA-LOSADA, M.R., LÓPEZ-DÍAZ, M.L., RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A. (2001). Sewage sludge fertiliser of a silvopastoral system with pines in Northwestern Spain. **Agroforest Syst.**, **53**: 1-10.
- MURPHY, D., LOVE, S. (1997). The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. **Vet Parasitol.**, **70**: 99-110.
- NÄREAHO, A., VAINIO, K., OKSANEN, A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. **Vet Parasitol.**, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.045
- NIELSEN, M.K., BAPTISTE, K.E., TOLLIVER, S.C., COLLINS, S.S., LYONS, E.T. (2010). Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. **Vet Parasitol.**, **174**: 77-84.
- NIELSEN, M.K., HAANING, N., OLSEN, S.N. (2006a). Strongyle egg shedding consistency in horses on farms using selective therapy in Denmark. **Vet Parasitol.**, **135**: 333-335.
- NIELSEN, M.K., KAPLAN, R.M., THAMSBORG, S.M., MONRAD, J., OLSEN, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. **Vet J.**, **174**: 23-32.
- NIELSEN, M.K., MONRAD, J., OLSEN, S.N. (2006b). Prescription-only anthelmintics--a questionnaire survey of strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. **Vet Parasitol.**, **135**: 47-55.
- NIELSEN, M.K., PETERSON, D.S., MONRAD, J., THAMSBORG, S.M., OLSEN, S.N., KAPLAN, R.M. (2008). Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. **Int J Parasitol.**, **38**: 443-453.
- OSTERMAN LIND, E. (2005). Prevalence and Control of Strongyle Nematode Infections of Horses in Sweden. Tesis Doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- OSTERMAN LIND, E., UGGLA, A., WALLER, P., HÖGLUND, J. (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. **Vet Parasitol.**, **128**: 261-269.

- OSTERMAN LIND, E.O., RAUTALINKO, E., UGGLA, A., WALLER, P.J., MORRISON, D.A., HÖGLUND, J. (2007). Parasite control practices on Swedish horse farms. **J Acta Vet Scand.**, **49**: 25.
- OWEN, J., SLOCOMBE, D. (2004). A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. **Can J Vet Res.**, **68**: 112-117.
- PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., VALERO-COSS, R.O., CORTIÑAS, F.J., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DE GIVES, P.M. (2011b). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydo spores. **Vet Parasitol.**, **179**: 277-282.
- PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, R., RODRÍGUEZ, I., FRANCISCO, I., CAZAPAL-MONTEIRO, C. F., ARIAS, M.S., SUÁREZ, J. L., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2011a). Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method. **Clin Vac Immunol.**, **18**: 1462-1466.
- PAZ-SILVA, A., PEDREIRA, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., DÍAZ, P., PANADERO, R., DÍEZ, P., MORRONGO, P. (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. **Parasitol Res.**, **88**: 568-573.
- PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., PEDREIRA, J., ARIAS, M.S., LÓPEZ, C., PANADERO, R., DÍAZ, P., DÍEZ, P., MORRONGO, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. **Parasitol Res.**, **91**: 328-331.
- PEMBERTON, D.J., FRANKS, C.J., WALKER, R.J., HOLDEN-DYE, L. (2001). Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl-alpha2 in the function of the native receptor. **Mol Pharmacol.**, **59**: 1037-1043.
- PÉREZ, R., CABEZAS, I., SUTRA, J.F., GALTIER, P., ALVINERIE, M. (2001). Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. **Vet J.**, **161**: 85-92.
- PÉREZ, R., GODOY, C., PALMA, C., MUÑOZ, L., ARBOIX, M., ALVINERIE, M. (2010). Plasma disposition and fecal elimination of doramectin after oral or intramuscular administration in horses. **Vet Parasitol.**, **170**: 112-119.
- PÉREZ, R.; GODOY, C.; PALMA, C.; CABEZAS, I.; MUÑOZ, L.; RUBILAR, L.; RBOIX, M.; ALVINERIE, M. (2002). Plasma Profiles of Ivermectin in horse following Oral or Intramuscular Administration. **J Vet Med. A**, **50**: 297-302.
- PRESIDENTE, P.J.A. (1985). **Methods for detection of resistance to anthelmintics**. En: Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs. Anderson, N., Waller, P.J. (Eds.). CSIRO Division of Animal Health, Glebe, NSW, Australia, pp. 13-28.

- PROUDMAN, C.J., FRENCH, N.P., TREES, A.J. (1998). Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. **Equine Vet J.**, **30**: 194-199.
- PROUDMAN, C.J., MATTHEWS, J.B. (2000). Control of intestinal parasites in horses. **Eq Pract (Feb)**: 90-97.
- PROUDMAN, C.J., TREES, A.J. (1996a). Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. **Vet Parasitol.**, **61**: 239-247.
- PROUDMAN, C.J., TREES, A.J. (1996b). Correlation of antigen-specific IgG and IgG(T) with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. **Paras Immunol.**, **18**: 499-506.
- RANDI, R. (1984). The use of ivermectin in horse: research and clinical observations. **Comp Cont Educ Pract.**, **6**: 516-522.
- REHBEIN, S., BARRICK, R.A., BATTY, A.F., DRAG, M.D., ROLFE, P.F., COX, J.L. (1999). Evaluation of the effect of simulated rainfall on the efficacy of Ivomec Pour-on against *Cooperia* spp. infection in cattle. **Parasitol Res.**, **85**: 783-786.
- REHBEIN, S., VISSER, M., YOON, S., MARLEY, E. (2007). Efficacy of a combination ivermectin/praziquantel paste against nematodes, cestodes and bots in naturally infected ponies. **Vet Rec.**, **161**: 722-724.
- REINEMEYER, C.R. (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. **Parasit Vectors 2 (Suppl. 2)**: S8.
- REINEMEYER, C.R., COURTNEY, C.H. (2001). **Antinematodal Drugs**. En: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (8th Edition). H. Richard Adams (Ed). Iowa State University Press, USA.
- RIEDER, N., BEELITZ, P., GOTHE, R. (1995). Incidence of *Parascaris equorum* in foals and their mares after strategic use of wide-spectrum anthelmintics for several years. **Tierarztl Prax.**, **23**: 53-58.
- RIGUEIRO, A., MOSQUERA, M.R., LÓPEZ DÍAZ, M.L., PASTOR, J.C., GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, M.P., ROMERO, R., VILLARINO, J.J. (2001). Reducción do risco de incendios forestais mediante o pastoreo do cabalo galego de monte. **O Común dos Veciños**, **3**: 12-14.
- RIGUEIRO-RODRÍGUEZ A., MOSQUERA-LOSADA, M.R., ROMERO-FRANCO, R., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.P., VILLARINO-URTIAGA, J.J. (2005). **Silvopastoral systems as a forest fire prevention technique**. En: Silvopastoralism and sustainable land management. M.R. Mosquera-Losada, J. McAdam, A. Rigueiro-Rodríguez (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, pp. 380-387.
- RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ-NÚÑEZ, P., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, P., McADAM, J.H., MOSQUERA-LOSADA, M.R. (2009). Agroforestry systems in Europe. Productive, Ecological and Social perspectives. **Adv Agroforestry**, **6**: 43-66.

- RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A., MOSQUERA-LOSADA, M.R., LÓPEZ-DÍAZ, M.L. (1998). Silvopastoral system in prevention of forest fires in the forest of Galicia (NW Spain). **Agroforestry forum** **9**: 3-8.
- RIVIERE, J.E., PAPICH, M.G. (2001). Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. **Adv Drug Deliv Rev.**, **50**: 175-203.
- RODRÍGUEZ-BERTOS, A., CORCHERO, J., CASTAÑO, M., PEÑA, L., LUZÓN, M., GÓMEZ-BAUTISTA, M. (1999). Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocecal junction of equids. **J Vet Med.**, **46**: 261-269.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A., MEANA, A. (2008). Resistencia antihelmíntica. **Monografía Equinus**, **23**: 88-101.
- ROLFE, P.F., DAWSON, K.L., NICHOLS, G.N., WEBSTER, M., RYAN, W.G. (1997). Efficacy of topical ivermectin following exposure of treated cattle to rain. **Vet Rec.**, **13**: 269-270.
- ROMANIUK, K., RESZKA, K., LASOTA, E. (2004). Influence of animal breeding manner on the occurrence of internal parasites. **Wiad Parazytol.**, **50**: 647-651.
- ROMASANTA, A., ROMERO, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., LÓPEZ, C., SUÁREZ, J.L., DÍAZ, P., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. **Immunol Invest.**, **32**: 131-142.
- SÁNCHEZ GÓMEZ, J.A. (2008). **Nuevas perspectivas del tratamiento antiparasitario en caballos salvajes. Trabajo de Investigación Tutelado.** Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J.L., MOCHALES, E., DACAL, V., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Efecto de ivermectina *pour on* sobre los estróngilos parásitos en caballos autóctonos PRG. **XV Congreso Anual de la Asociación Española de Veterinarios Especialistas en Équidos.** Barcelona, 31 de enero – 1 de febrero.
- SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, J., DACAL, V., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2007). Nuevas perspectivas de control parasitario en caballos salvajes: Pura Raza Galega. **Situación actual y futuro de las razas puras**, Volumen Extra: 124.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A., PAZ-SILVA, A. (2010). A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. **Vet Parasitol.**, **171**: 314-320.

- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUÁREZ, J.L., PANADERO, R., PEDREIRA, J., LÓPEZ, C., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONGO, P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). **Vet Res Commun.**, **26**: 361-370.
- SANDIN, A., SKIDELL, J., HÄGGSTRÖM, J., NILSSON, G. (2000). Postmortem findings of gastric ulcers in Swedish horses older than age one year: a retrospective study of 3715 horses (1924-1996). **Equine Vet J.**, **32**: 36-42.
- SANGSTER, C. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomins: will it occur with the avermectin/milbemycins? **Vet Parasitol.**, **85**: 189-204.
- SCHOUGAARD, H., NIELSEN, M.K. (2007). Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. **Vet Rec.**, **160**: 439-440.
- SCHUMMER, A., WILKENS, H., VOLLMERHAUS, B., HABERMEL, K.H. (1981). **Skin and cutaneous organs of the horse**. En: The Circulatory System, the Skin, and the Cutaneous Organs of Domestic Mammals. A. Schummer, H. Wilkens, B. Vollmerhaus, K.H. Habermehl (Eds.). Springer-Verlag, New York, USA, pp 537.
- SHARROW, S.H. (1999). **Silvopastoralism: competition and facilitation between trees, livestock and improved grass-clover pastures on temperate rainfed lands**. En: Agroforestry in Sustainable Agricultural Systems. L.E. Buck, J.P. Lassoie, E.C.M. Fernandes (Eds.). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA, pp. 416.
- SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Vet Parasitol.**, **59**: 139-156.
- SILVA, A.V.; COSTA, H.M.; SANTOS, H.A.; CARVALHO, R.O. (1999). Cyathostominae (Nematoda) parasites of *Equus caballus* in some Brazilian states. **Vet Parasitol.**, **86**: 15-21.
- SLIVINSKA, K. (2006). The gastro-intestinal parasites community of the Przewalski's horse, *Equus przewalskii* Poljakov, 1881, and the domestic horse in the Chernobyl exclusion zone. **Wiad Parazytol.**, **52**: 55-58.
- SLOCOMBE, J.O. (2004). A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. **Can J Vet Res.**, **68**: 112-117.
- SLOCOMBE, J.O. (2006). A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. **Vet Parasitol.**, **136**: 127-135.
- SLOCOMBE, J.O., DE GANNES, R.V., LAKE, M.C. (2007). Macrocytic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. **Vet Parasitol.**, **145**: 371-376.
- SOTIRAKI, S.T., BADOUVAS, A.G., HIMONAS, C.A. (1997). A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalis-Greece. **J Equine Vet Sci.**, **10**: 550-552.

- SOULSBY, L. (2007). New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. **Vet J.**, **174**: 6-7.
- SPEARMAN, R.I.C. (1964). **The mammalian epidermis and its appendages**. En: The integument: A textbook of skin biology. R.I.C. Spearman (Ed.). Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 112.
- STEINBACH, T., BAUER, C., SASSE, H., BAUMGÄRTNER, W., REY-MORENO, C., HERMOSILLA, C., DAMRIYASA, I.M., ZAHNER, H. (2006). Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. **Vet Parasitol.**, **139**: 115-131.
- STRONG, L. (1992). Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. **Bull Entomol Res.**, **82**: 265-267.
- SUÁREZ, V.H., LIFSCHITZ, A.L., SALLOVITZ, J.M., LANUSSE, C.E. (2003). Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. **J Appl Entomol.**, **127**: 481-488.
- TARIGO-MARTINIE, J.L., WYATT, A.R., KAPLAN, R.M. (2001). Prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in cyathostomes of horses. **J Am Vet Med Assoc.**, **218**: 1957-1960.
- TAYLOR, S.M., KENNY, J. (1995). Comparison of moxidectin with ivermectin and pyrantel embonate for reduction of faecal egg counts in horses. **Vet Rec.**, **137**: 516-518.
- TAYLOR, S.M., MALLON, T.R., BLANCHFLOWER, W.J., KENNEDY, D.G., GREEN, W.P. (1992). Effects of diet on plasma concentrations of oral anthelmintics for cattle and sheep. **Vet Rec.**, **130**: 264-268.
- THEODORIDIS, Y., FOUNTA, A., GEORGOULAKIS, I. (1999). Gastrointestinal nematodes of equine in the region of Thessaloniki. **Bull Hell Vet Med Soc.**, **50**: 127-129.
- TIMONEY, P.J. (1996). Contagious equine metritis. **Comp Immun Microbiol Infect Dis.**, **19**: 199-204.
- TRAVERSA, D., FICHI, G., CAMPIGLI, M., RONDOLOTTI, A., IORIO, R., PROUDMAN, C.J., PELLEGRINI, D., PERRUCCI, S. (2008). A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). **Vet Parasitol.**, **152**: 271-277.
- TRAVERSA, D., GIANGASPERO, A., IORIO, R., OTRANTO, D., PAOLETTI, B., GASSER, R.B. (2004). Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. **Parasitology**, **129**: 733-739.
- TRAVERSA, D., IORIO, R., OTRANTO, D., GIANGASPERO, A., MILILLO, P., KLEI, T.R. (2009). Species-specific identification of equine cyathostomes resistant to fenbendazole and susceptible to oxibendazole and moxidectin by macroarray probing. **Exp Parasitol.**, **121**: 92-95.

- TRAVERSA, D., KLEI, T.R., IORIO, R., PAOLETTI, B., LIA, R.P., OTRANTO, D., SPARAGANO, O.A., GIANGASPERO, A. (2007). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. **Prev Vet Med.**, **82**: 314-320.
- TRAWFORD, A.F., BURDEN, F.A., HODGKINSON, J. (2005). Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at The Donkey Sanctuary, UK. **Proceedings of the 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.**
- TROTZ-WILLIAMS, L., PHYSICK-SHEARD, P., McFARLANE, H., PEARL, D.L., MARTIN, S.W., PEREGRINE, A.S. (2008). Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. **Vet Parasitol.**, **153**: 73-84.
- TYDÉN, E., TALLKVIST, J., TJALVE, H., LARSSON, P. (2009). P-glycoprotein in intestines, liver, kidneys and lymphocytes in horses. **J Vet Pharmacol Ther.**, **32**: 167-176.
- UHLINGER, C. (1990). Effects of three anthelmintic schedules on the incidence of colic in horses. **Equine Vet J.**, **22**: 251-254.
- UHLINGER, C. (1991). Clinical and epidemiologic features of an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **J Am Vet Med Assoc.**, **198**: 126-128.
- UHLINGER, C.A. (1993). Uses of faecal egg count data in equine practice. **Comp Cont Ed Pract Vet.**, **15**: 742-748.
- UTZINGER, J., RINALDI, L., LOHOURIGNON, L.K., ROHNER, F., ZIMMERMANN, M.B., TSCHANNEN, A.B., N'GORAN, E.K., CRINGOLI, G. (2008). FLOTAC: a new sensitive technique for the diagnosis of hookworm infections in humans. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, **102**: 84-90.
- VAN HERWERDEN, L., GASSER, R.B., BLAIR, D. (2000). ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. **Int J Parasitol.**, **30**: 157-169.
- VAN WYK, J.A. (2001). Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort J Vet Res.**, **68**: 55-67.
- VARGAS, D., DEL PINO, S., GONZÁLEZ, C.G., VIDAL, M. (2001). Implementación de un ensayo ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis equina. **Bol Chil Parasitol.**, **57**: 91-94.
- VERONESI, F., MORETTA, I., MORETTI, A., FIORETTI, D.P., GENCHI, C. (2009). Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. **Vet Parasitol.**, **161**: 138-141.

- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., COLES, G.C., JACKSON, F., BAUER, C., BORGSTEEDE, F., CIRAK, V.Y., DEMELER, J., DONNAN, A., DORNY, P., EPE, C., HARDER, A., HÖGLUND, J., KAMINSKY, R., KERBOEUF, D., KÜTTLER, U., PAPADOPOULOS, E., POSEDI, J., SMALL, J., VÁRADY, M., VERCRUYSSSE, J., WIRTHELER, N. (2009a). Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitol Res.**, **105**: 825-834.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., FRITZEN, B., DEMELER, J., SCHÜRSMANN, S., ROHN, K., SCHNIEDER, T., EPE, C. (2007). Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. **Vet Parasitol.**, **144**: 74-80.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., TRAVERSA, D., DEMELER, J., ROHN, K., MILILLO, P., SCHURMANN, S., LIA, R., PERRUCCI, S., DI REGALBONO, A.F., BERALDO, P., BARNES, H., COBB, R., BOECKH, A. (2009b). Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. **Parasit Vectors**, **2 Suppl 2**: S3.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., VON WITZENDORFF, C., SIEVERS, G., SCHNIEDER, T. (2002). Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. **Vet Parasitol.**, **108**: 227-235.
- WALL, R., STRONG, L. (1987). Environmental consequences of treating cattle with antiparasitic drug ivermectin. **Nature**, **324**: 418-420.
- WILLIAMSON, R.M., BEVERIDGE, I., GASSER, R.B. (1998). Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. **Aust Vet J.**, **76**: 618-621.
- WONG, D., BUECHNER-MAXWELL, V., MANNING, T. (2005). Equine Skin: Structure, Immunologic Function, and Methods of Diagnosing Disease. **CompendiumVet.com**, **June**.
http://cp.vetlearn.com/Media/PublicationsArticle/PV_27_06_463.pdf
- WOOD, I.B., AMARAL, N.K., BAIRDEN, K., DUNCAN, J.L., KASSAI, T., MALONE, J.B., PANKAVICH, J.A., REINECKE, R.K., SLOCOMBE, O., TAYLOR, S.M., VERCRUYSSSE, J. (1995). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.): second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Vet Parasitol.**, **58**: 181-213.
- ZHOU, D., LIN, J., QIN, M. (2004). Extensive grazing and designed feeding with supplemented legume forages on natural grassland. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, **15**: 1187-1193.